



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Identificación de células enteroendocrinas productoras
del péptido similar a glucagón tipo 1 (GLP-1) en
intestinos de alpacas**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Cesar Armando HIDALGO PÉREZ

ASESOR

Mg. María Elith VÁSQUEZ CACHAY

Lima, Perú

2013



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Hidalgo C. Identificación de células enteroendocrinas productoras del péptido similar a glucagón tipo 1 (GLP-1) en intestinos de alpacas [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2013.



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día viernes **31 de Mayo del 2013**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **011-EAPMV/FMV-2013**, integrado por los siguientes profesores:

RAÚL ROSADIO ALCÁNTARA	Presidente del Jurado
MARÍA VÁSQUEZ CACHAY	Asesora de la Tesis
ALBERTO MANCHEGO SAYÁN	Miembro del Jurado
BORIS ANTONIO LIRA MEJÍA	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **HIDALGO PÉREZ, CESAR ARMANDO**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS ENTEROENDOCRINAS PRODUCTORAS DEL PÉPTIDO SIMILAR A GLUCAGÓN TIPO 1 (GLP-1) EN INTESTINOS DE ALPACAS"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:40 Horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

.....
Raúl Rosadio Alcántara: PhD. Prof. Principal, T.C.

.....
María Vásquez Cachay: Mg. Prof. Asociado, D.E.

.....
Alberto Manchego Sayán: MV. Prof. Asociado, D.E.

.....
Boris Antonio Lira Mejía: Mg. Prof. Asociado, T.C.



AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a la Dra. María Vásquez, mi directora de tesis, por la paciencia brindada. Antes durante y después del desarrollo del presente trabajo de investigación

Al Dr. José Luis Rodríguez por el enorme apoyo y paciencia que me brindo para culminar esta tesis, muchas gracias

Le agradezco a cada uno de los integrantes del laboratorio de Fisiología Animal quienes participaron en el desarrollo de esta tesis, Dr. Boris, Luz, Verónica, Nilda, Juan, Stephanie, etc. Si me olvido de alguien, las disculpas del caso. Infinitas gracias

A mi alma mater, la facultad de medicina veterinaria de la universidad nacional mayor de san marcos por la formación profesional que me ha brindado. A todos mis compañeros, amigos y hermanos que conocí en esta hermosa facultad, por los momentos compartidos y amistad brindada. Franz, Sergio, Nilda, Iván, Janet, luz, Nancy, María, Carmen, Mónica, Aimé, Katy, Aldo, José Luis, Manuel, Carina. Gracias a todos

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a Felicita Pérez Aguilar, quien fue padre y madre para mi. Le agradezco infinitamente por todo el esfuerzo realizado conmigo y mi hermana. Por tus cuidados, tu amor y tus consejos, te estaré eternamente agradecido. Asimismo a mis abuelos, papito y mamita, por tenerme bajo su cuidado u brindarme apoyo cuando lo necesitaba. Gracias a ustedes tres, soy quien soy, el día de hoy.

Se lo dedico a toda mi familia, a mi hermana Cynthia. A mis primos, Pauline, Jean-Yves, Marie Christine, Isabella y Lisa. A mis tíos, Sonia, Eduardo, Ino, Sixta y Carmen (que en paz descanse. Mis sobrinos Jean, Camila y Jazmín.

Finalmente, se lo dedico a mi gran amor Jani. Por quererme tanto, apoyarme y aconsejarme siempre. Gracias por todo.

CONTENIDO

Página

RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE NEXOS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FOTOS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Camélidos sudamericanos: alpaca.....	3
2.2. Mucosa intestinal	5
2.3. Ubicación intestinal de las células l	6
2.4. Péptido similar al glucagón tipo 1 (glp-1).....	7
2.4.1. Péptidos derivados del proglucagón.....	7
2.4.2. Péptidos derivados del enteroglucagón	8
2.4.3. Síntesis, secreción, y degradación de GLP-1	9
2.4.4. Acción del GLP-1 y receptor del GLP-1 (GLP-1R).....	10
2.4.4.1. Acciones extrapancreáticas del GLP-1.....	11
2.4.4.2. Acción del GLP-1 sobre el sistema nervioso central	12
2.4.5. GLP-1 y el balance energético	14
2.4.5.1. Balance energético por acción del GLP-1 a nivel central	14
2.4.5.2. Balance energético por acción del GLP-1 a nivel periférico.....	15
2.4.5.3. Control energético por el GLP-1 a corto y largo plazo	17
2.4.6. Relación del GLP-1 con la obesidad y la pérdida de peso	20

2.5	Tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina.....	22
III.	MATERIALES Y METODOLOGÍA	25
3.1.	Lugar de estudio.....	25
3.2.	Animales	25
3.3.	Materiales.....	26
3.3.1.	Material para la recolección de muestras	25
3.3.2.	Equipos y materiales para el procesamiento de muestras mediante inmunohistoquímica.....	25
3.3.2.1.	Sustancias, reactivos y colorantes	26
3.3.2.2.	Equipos de laboratorio	26
3.4.	Metodología	27
3.4.1.	Sacrificio de los animales.....	27
3.4.2.	Apertura del animal.....	27
3.4.3.	Toma de muestras intestinales para inmunohistoquímica.....	27
3.4.4.	Procesamiento de muestras intestinales fijadas en formol	28
3.5.	Determinación del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) mediante inmunohistoquímica.....	28
3.6.	Análisis de Imágenes.....	28
3.7.	Análisis estadístico.....	29
IV.	RESULTADOS.....	30
V.	DISCUSIÓN	35
VI.	CONCLUSIONES	38
VII.	RECOMENDACIONES	39
VIII.	LITERATURA CITADA.....	41
IX.	ANEXOS.....	56
X.	APENDICE.....	61

RESUMEN

El presente estudio tuvo por objetivo inmunolocalizar la distribución de las células enteroendocrinas L, productoras del péptido similar al glucagón (GLP-1), en el intestino de alpacas. Una incretina de gran importancia debido a su función reguladora de la glucemia. Se utilizaron 36 crías de alpaca de 0-45 días de edad y adultos, distribuidos en 7 grupos etáreos.

0 días= <24h, 1-7 días, 8-15 días, 16-21 días, 27-34 días, 35-45 días y adultos. Las muestras intestinales fueron procesadas por inmunohistoquímica usando el anticuerpo monoclonal antiGLP-1. Las células positivas fueron contadas en 15 ejes cripta-vellosidad de cada porción intestinal en cada animal. Los resultados evidencian, respecto de los grupos etáreos, que en el día 0, el yeyuno es la porción que contiene mayor número de células L (productoras de GLP-1); mientras que, en los otros grupos son yeyuno e íleon. Respecto a la ubicación, se determina en duodeno un aumento significativo ($p<0.05$) de células L desde los 8 días en adelante; en yeyuno el mayor número de células se encuentra a los 0 días; en íleon el mayor número celular se encuentra desde los 8 a 45 días; y en el colon el mayor número lo encontramos en los adultos. Se concluye que las células L en alpacas se encuentran presentes desde el nacimiento mayoritariamente en yeyuno e íleon.

Palabras clave: GLP-1, intestinos, células L, alpaca

ABSTRACT

The aim of this study was to immunolocalize the distribution of enteroendocrine L cells, producers of glucagon-like peptides (GLP-1), in the intestine of alpacas. An incretin of great importance due to its role as glucose regulator. 36 baby alpacas (0-45 days old) and adults were use and distributed in 7 age groups: 0 days, 1-7 days, 8-15 days, 16-21 days, 27-34 days, 35-45 days, and adults. The intestinal samples were processed by immunohistochemistry using antiGLP-1 monoclonal antibody. Positive cells were counted in 15 crypt-villus axis of each intestinal portion in each animal. The results show, for the age groups, that in Group 1 the jejunum is the portion containing the largest number of L cells (producers of GLP-1); whereas in the other groups are jejunum and ileum. Regarding location, in the duodenum is determined a significant increase ($p<0.05$) of L-cells from 8 days to adults; in jejunum the greater number of cells is found in 0 days; in ileum higher number of cells is found from 8 to 45 days; and in colon the highest number is found in adults. We conclude that L-cells in alpaca are present from birth and the portions, duodenum and jejunum,mostly.

Keywords: GLP-1, intestines, L cells, alpaca

LISTA DE CUADROS

	Página
CUADRO 1	Número de células L en intestino de alpacas /eje cripta vellosidad, expresados en media \pm desviación standard, por el método ANOVA DE UN FACTOR34
CUADRO 2	Número de células L/eje cripta vellosidad en intestino de alpacas, haciendo uso del paquete estadístico SSPSS 15(anexo).....56
CUADRO 3	Número de Células L/eje cripta vellosidad en duodeno de alpacas, haciendo uso del paquete estadístico SSPSS 15(anexo).....57
CUADRO 4	Número de células L/eje cripta vellosidad en yeyuno de alpacas, haciendo uso del paquete estadístico SSPSS 15(anexo).....57
CUADRO 5	Número de células L/eje cripta vellosidad en íleon de alpacas, haciendo uso del paquete estadístico SSPSS 15(anexo).....57
CUADRO 6	Número de células L/eje cripta vellosidad en ciego de alpacas, haciendo uso del paquete estadístico SSPSS 15(anexo).....58
CUADRO 7	Número de células L/eje cripta vellosidad en colon de alpacas, haciendo uso del paquete estadístico SSPSS 15(anexo).....58

LISTA DE FOTOS

Página

FIGURA 1	Célula L (productora de GLP-1) ubicada en la cripta de Lieberkühn de la mucosa intestinal de colon de alpaca, de 18 días de edad, mediante inmunohistoquímica y contrastada con hematoxilina de Harris, 400x.....	29
FIGURA 2	Célula L (productora de GLP-1) ubicada en la cripta de Lieberkühn de la mucosa intestinal del yeyuno de alpaca, de 21 días de edad, mediante inmunohistoquímica y contrastada con hematoxilina de Harris, 400x.....	31
FIGURA 3	Célula L (productora de GLP-1) ubicada en la cripta de Lieberkühn de la mucosa intestinal del yeyuno de alpaca, de 1 día de edad, mediante inmunohistoquímica y contrastada con hematoxilina de Harris, 400x.....	31
FIGURA 4	Célula L (productora de GLP-1) ubicada en la zona apical de la vellosidad del yeyuno de alpaca, de 5 días de edad, mediante inmunohistoquímica y contrastada con hematoxilina de Harris, 400x.....	32

FIGURA 5	Célula L (productora de GLP-1) ubicada en la zona apical de la vellosidad del colon de alpaca, de un recién nacido, mediante inmunohistoquímica y contrastada con hematoxilina de Harris, 400x.....	32
FIGURA 6	Célula L (productora de GLP-1) ubicada en la zona apical de la vellosidad del colon de alpaca, de 18 días de edad,, mediante inmunohistoquímica y contrastada con hematoxilina de Harris, 400x.....	33

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I.	Procedimiento de fijación y parafinado de tejidos para IHQ (Realizado en SENASA).....	56
ANEXO II.	Desparafinado e hidratación.....	56
ANEXO III.	Inmunohistoquímica.....	57
ANEXO IV.	Deshidratación y Montaje.....	58
ANEXO V	Cuadro 2. Número de células L/eje cripta vellosidad en intestino de alpacas.....	58
	Cuadro 3. Número de Células L/eje cripta vellosidad en duodeno de alpacas.....	59
	Cuadro 4. Número de células L/eje cripta vellosidad en yeyuno de alpacas.....	59
	Cuadro 5. Número de células L/eje cripta vellosidad en íleon de alpacas.....	59
	Cuadro 6. Número de células L/eje cripta vellosidad en ciego de alpacas.....	60
	Cuadro7. Número de células L/eje cripta.....	60

I. INTRODUCCIÓN

Las alpacas son los camélidos domésticos de mayor importancia en la economía de los Andes del Perú. Los camélidos sudamericanos domésticos, a veces en asociación con ovinos, constituyen el principal medio de utilización productiva de extensas áreas de pastos naturales en las zonas alto andinas donde no es posible la agricultura y la crianza exitosa de otras especies de animales domésticos. Los camélidos convierten con eficiencia la vegetación nativa de estos ambientes en carne y fibras de alta calidad, además sus pieles y cueros tienen múltiples usos industriales y artesanales.

Las alpacas, como otras especies animales, especialmente en la etapa de lactación, son susceptibles de sufrir afecciones que los conducen incluso a la muerte de no recibir la cantidad necesaria de energía en su dieta, o a causa de trastornos en el metabolismo de los carbohidratos. Así mismo, el desarrollo de la mucosa y del sistema inmune intestinal depende del alimento consumido y su calidad, así como de la implantación de la flora bacteriana, ya que el animal nace con un sistema digestivo estéril (Sklan, 2000; Ogra y Welliver, 2008).

La alta mortalidad de la alpaca en su etapa postnatal podría ser disminuida si se conociera con detalle la fisiología gastrointestinal en esta etapa, pues existen escasos estudios en el desarrollo funcional del tracto intestinal de las crías de alpacas especialmente en la parte

absortiva de diferentes sustancias como la glucosa y de la regulación de la homeostasis energética. Pues es en el tracto digestivo donde se observa la mayor incidencia de patologías en los primeros días de vida las que cursan con una mortalidad.

Estudios demuestran que los camélidos sudamericanos presentan la habilidad de mantener altas concentraciones de glucosa en sangre comparado con otras especies.

De allí que el presente estudio tiene por objetivo inmunolocalizar la distribución de las células enteroendocrinas L, productoras del péptido similar al glucagón (GLP-1), una incretina de gran importancia debido a su función reguladora de la glucemia.

Esta tesis forma parte de un grupo de estudios que busca describir la normalidad de la fisiología digestiva en crías de alpaca, entre ellas:

- Identificación inmunohistoquímica de transportadores de glucosa intestinal y absorción de glucosa durante el desarrollo y maduración del intestino delgado de crías de alpacas (Rodriguez *et al.*, 2012)
- Identificación de las células de paneth en el intestino delgado de alpacas en los primeros 21 días de edad. (Lira *et al.*, 2012)
- Ph de la superficie luminal de la mucosa gastrointestinal de crías de alpacas durante las primeras semanas de edad. (Vásquez *et al.*, 2012)
- Identificación de células productoras de péptido tipo Glucagon-1 (glp-1) en epitelio intestinal de crías de alpacas. (Vásquez et al. 2011)

II. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1 CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS: ALPACA

Nuestro país es el centro de producción más importante de camélidos sudamericanos, constituyendo un rol importante del poblador andino dentro de la actividad ganadera; los ecosistemas sobre los cuales se desarrolla esta actividad están por encima de los 4,200 msnm. Tanto la alpaca como la llama son especies que durante un proceso de miles de años se han adaptado a este medio ecológico agreste, y en la actualidad brinda la posibilidad de ingresos económicos. El Perú posee aproximadamente 4'961,765 de ejemplares entre llamas y alpacas según el MINAG (2007), por tanto es el primer productor a nivel mundial. La región Puno es la que ostenta la mayor población a nivel nacional, con aproximadamente 2'026,600 alpacas y 437,090 llamas (MINAG, 2007).

Los camélidos sudamericanos domésticos, a veces en asociación con ovinos, constituyen el principal medio de utilización productiva de extensas áreas de pastos naturales en las zonas alto andinas donde no es posible la agricultura y la crianza exitosa de otras especies de animales domésticos. Los camélidos convierten con eficiencia la vegetación nativa de estos ambientes en carne y fibras de alta calidad, además sus pieles y cueros tienen múltiples usos industriales y

artesanales. El estiércol es otro subproducto valioso que se usa como combustible para la cocción de los alimentos y fertilizante para los cultivos; y por otro lado, la llama cumple además una importante función de transporte (Iñiguez y Alem, 1996).

De Los Ríos (2006) estima que al menos un millón y medio de personas se dedican a la crianza de camélidos en la región alto andina del Perú. Las áreas productoras de camélidos en el Perú incluyen las provincias con mayor pobreza y marginalización. En Bolivia por ejemplo, en base a las estimaciones del INE Bolivia (2009) y UNEPCA (1999) es posible estimar que la producción de llamas beneficia entre 37.000 a 50.000 familias de productores de escasos recursos; sin embargo, esta producción aun no representa una vía directa para reducir la pobreza y la marginalización de sus productores, no obstante la demanda incrementada por los productos de esta especie.

Según comenta Ameghino (1991), el mayor porcentaje de muertes se concentran en la etapa neonatal, estudio realizado en las organizaciones alpaqueras ubicadas en Puno y Junín. Al parecer los primeros 30 días son los más críticos. Donde se evidencian claramente dos tendencias en las mortalidades. La primera onda se observa muy tempranamente y ocurre en los primeros días de edad (hasta 4 días) y la segunda entre 5 hasta los 30 días de edad. En los primeros días las causas en la gran mayoría son productos de las inclemencias ambientales y/o aparentemente de un inadecuado manejo y reportadas como nacidas muertas, muertas al nacer, principalmente por inanición e hipotermia. Ambas situaciones pueden desencadenarse igualmente de nacimientos de crías débiles o traumatizadas por partos difíciles. La inanición e hipotermia también suelen observarse en crías aparentemente normales pero negadas por la madre y/o en aquellos neonatos con dificultades para acceder rápidamente al calostro materno (fuente de inmunoglobulinas y nutrientes). Las muertes a partir del 5-7 días de nacido son en su mayoría de origen infeccioso. (Ameghino y De Martini, 1991; Cid, 2010). Por tal motivo las crías recién nacidas susceptibles a hipotermia, ya sea por los motivos anteriormente

mencionados o por haber nacido en época de granizada, nevada, lluvias fuertes o fuertes heladas deben tener los mejores cuidados e implementación de calostro y/o energizante para mantenerlas a una temperatura y evitar la muerte. (Cid, 2010).

2.2 MUCOSA INTESTINAL

El desarrollo de la mucosa y del sistema inmune intestinal depende del alimento consumido y su calidad, así como de la implantación de la flora bacteriana, ya que el animal nace con un sistema digestivo estéril (Ogra y Welliver, 2008; Sklan, 2000). El porcentaje del desarrollo del tracto intestinal al final de la gestación es diferente en tres grupos de animales, mientras que en humanos y primates es de un 70 - 90%, en los animales de granja (cerdos, ovejas, vacas) es un 88-95% y en roedores y algunos animales carnívoros de un 94 a 97%. En general los animales domésticos tienen un tiempo intermedio de desarrollo del intestino, expresando grupos de genes que indican cambios de maduración al nacimiento y al destete (entre 3 y 6 semanas postnacimiento), dependiendo de las especies (Sangild, 2006). En general la masa celular del epitelio intestinal aumenta entre un 50 a 80% en los dos primeros días en respuesta a estímulos alimenticios hormonales y microbiológicos medio ambientales del tracto (Sangild *et al*, 2000; Schmidt *et al*, 2004).

La absorción de nutrientes se ve afectada en enterocitos inmaduros siendo las macromoléculas que ingresan por endocitosis las más afectadas que los nutrientes que pasan pasivamente o dependientes de concentración (ácidos grasos y fructosa); pero es más importante el transporte de monosacáridos como glucosa la que otorga los requerimientos energéticos del neonato para su adaptación al nuevo medio ambiente (Buddington *et al.*, 2001). El ayuno y la exposición a patógenos causa una disminución en el crecimiento de las vellosidades intestinales, haciendo al animal más susceptible a infecciones de microorganismos patógenos (Sauter *et al.*, 2004).

En los camélidos sudamericanos los estudios de la fisiología del tracto intestinal han determinado que existe una variación del pH a lo largo del tracto intestinal que reflejan las actividades digestivas secretoras como microbiológicas de cada porción del tracto (Esquerre y Samaniego, 1976a; Vásquez *et al.*, 2012), asimismo existe una disminución progresiva de la elevada glucemia observada al nacimiento hasta alcanzar valores similares al adulto alrededor del cuarto mes de vida, y teniéndose una concentración ascendente de ácidos grasos volátiles en la sangre hasta el cuarto mes de vida, indicando que existen tres estadios metabólicos en alpacas: el estadio no ruminal (del nacimiento a 1 mes de edad), estadio transicional (entre el segundo y el mes de vida) y estado rumiante (a partir del cuarto mes de vida) (Esquerre *et al.*, 1976b).

Los estudios de metabolitos energéticos como carbohidratos han sido asociados con la supervivencia neonatal en las crías de alpacas encontrándose una glucemia al nacimiento la que disminuye exponencialmente en función a la edad, sin embargo el contenido de fructosa plasmática es mantenida en 0.1mg %, y cuando estos disminuyen existe un mayor riesgo de mortalidad (Esquerre *et al.*, 1979). Los encargados de permitir el ingreso de azúcares simples como la glucosa desde el intestino hacia la circulación sistémica o hacia los tejidos son los transportadores de glucosa (Rogers *et al.*, 2002; Doege *et al.*, 2001).

2.3 UBICACIÓN INTESTINAL DE LAS CÉLULAS L

En humanos, las células que presentan inmunoreactividad al GLP-1 han sido detectadas desde el yeyuno proximal hasta el recto con el uso de un anticuerpo monoclonal específico para el C-terminal de GLP-1 (Eisselle *et al.*, 1992). La marcación fue asociada específicamente a las células enteroendocrinas L de la mucosa intestinal, sobre todo en la parte basal. Encontrándose un aumento continuo de la densidad (células/mm²superficie) de las células inmunorreactivas desde la porción proximal hacia la distal del colon, inclusive determinando un gran número

celular en el recto; variando la densidad de las células inmunorreactivas al GLP-1 según las especies en un orden característico: ratas>cerdos>hombre (Eissele *et al.*, 1992).

En el intestino de cerdos y del humano un gran número de células se encuentran en el yeyuno distal y en el íleon; mientras que en las ratas la mayor densidad celular se da en el íleon. Una vez más, un aumento continuo del número de células positivas al GLP-1 fue evidente desde la porción proximal a la porción distal del intestino delgado y grueso. Estos datos morfológicos indican que la secreción del GLP-1 en el intestino delgado se da principalmente en la porción distal para detectar y responder a la presencia de nutrientes que han escapado a la superficie de absorción del intestino delgado proximal. El proglucagón escindido en las células L del intestino grueso muestran un proceso completamente eficiente, cuyo producto final es el GLP-1 biológicamente activo (Deacon *et al.* 1995), concluyéndose entonces que el intestino grueso es un lugar potencialmente importante para la expresión del GLP-1.

2.4 PÉPTIDO SIMILAR AL GLUCAGON TIPO 1 (GLP-1)

2.4.1 Péptidos derivados del proglucagón

Los péptidos derivados de proglucagón (PGDPs) son codificados por el único gen del proglucagón. En tejidos específicos donde se realiza el procesamiento postraducciona es necesario la acción de la enzima prohormona convertasa (PC). La PC 1 es esencial para la generación del péptido similar al glucagón (GLP) en las células enteroendocrinas (Dhanvantari *et al.*, 1996, Rothenberg *et al.*, 1995), mientras que PC2 es fundamental para el procesamiento del glucagón pancreático en las células alfa de los islotes (Furuta *et al.*, 1999, Rouille *et al.*, 1994). Los PGDPs son producidos por las células endocrinas en respuesta a cambios de glucosa en sangre (glucagón pancreático en los islotes) o ingestión de nutrientes (GLP-1 y GLP-2 en el intestino) y ejercen sus efectos a través de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). El

glucagón es liberado por las células alfa por los islotes pancreáticos en respuesta a la reducción de los niveles de glucosa en sangre y estimula la producción de glucosa y la degradación del glucógeno en el hígado. Los péptidos intestinales GLP-1 y GLP-2 regulan las múltiples vías de homeostasis de la energía y absorción de glucosa, respectivamente. GLP-1 y GLP-2 también aumentan el número de células y la masa de la mucosa intestinal, respectivamente, por la proliferación cada vez mayor y la inhibición de la apoptosis (Drucker, 2003).

2.4.2 Péptidos derivados del enteroglucagón

El término enteroglucagón se refiere a los GLPs intestinales, principalmente la glicentina y oxintomodulina, que muestran la superposición de inmunoreactividad cuando se incuban con diversos antisueros dirigidos contra el glucagón. Glicentina y oxintomodulina son productos del proglucagón en células endocrinas del intestino y son co-secretados por las células L del intestino junto con el GLP-1 y GLP-2 (Orskov *et al.*, 1986). Glicentina estimula la insulina e inhibe la secreción de glucagón (Ohneda *et al.*, 1995), inhibe la secreción de ácido gástrico (Kirkegaard *et al.*, 1982), regula la motilidad intestinal (Shibata *et al.* 2001) y estimula el crecimiento del intestino (Drucker 1996, Myojo *et al.*, 1997).

Oxintomodulina es un péptido de 37 aminoácidos que estimula la secreción de insulina, enlentece el vaciado gástrico, e inhibe la secreción de ácido gástrico (Jarrousse *et al.*, 1984, Jarrousse *et al.*, 1985, Schjoldager *et al.*, 1988, Schjoldager *et al.*, 1989). Oxintomodulina también estimula la absorción intestinal de glucosa y disminuye la secreción de enzimas pancreáticas en ratas (Collie *et al.*, 1997; Anini *et al.*, 2000), mientras que la administración central intracerebroventricular de oxintomodulina conduce a una reducción en la ingesta de alimentos, tanto en roedores en ayunas como en alimentados (Dakin *et al.*, 2001). El mecanismo por el cual oxintomodulina ejerce estos efectos todavía no está claro, sin embargo, oxintomodulina muestra debilidad para activar el receptor del glucagón (GCGR) y pueden imitar débilmente la acción del glucagón en hígado y páncreas (Baldiisera *et al.*, 1988). Además, el

efecto anorexígeno de oxintomodulina en ratas puede ser bloqueado por la exendina (Dakin *et al.*, 2001). Las acciones anorexigénicas de la oxintomodulina son detectables en ausencia de receptores de glucagón, pero están ausentes en ratones mutantes para el receptor GLP-1 (GLP-1R), lo que sugiere que oxintomodulina regula la ingesta de alimentos a través del GLP-1R (Baggio *et al.*, 2004). La oxintomodulina reduce la ingesta de alimentos e induce la saciedad a corto plazo en estudios en sujetos humanos sanos (Cohen *et al.*, 2003).

2.4.3 Síntesis, secreción, y degradación de GLP-1

GLP-1 es una hormona peptídica de 30 aminoácidos sintetizado principalmente en dos formas equipotentes molecularmente, el GLP-1(7-36) y GLP-1(7-37), siendo la forma biológicamente activa el GLP-1 (7-36). Después de la ingestión de nutrientes, se pueden identificar dos períodos de la secreción de GLP-1: una fase temprana y una fase tardía. La primera fase se inicia a pocos minutos de comer y puede durar de 30 a 60 min. La segunda fase es más prolongada, con una duración 1-3 h después de una comida (Elliott *et al.*, 1993; Herrmann *et al.*, 1995), y es probablemente atribuible a la interacción directa de los nutrientes digeridos en el lumen con las células L. La primera fase de la secreción de GLP-1 es probablemente regulada a través de una combinación de mediadores neuronales y hormonales, que siguen siendo poco conocidos (Rocca *et al.*, 1999, Dube *et al.*, 2000, Hansen *et al.*, 2004).

GLP-1 se inactiva rápidamente y desaparece de la circulación tras su secreción por las células L intestinales. La inactivación del GLP-1 se da por la acción de la serina proteasa dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). Esta enzima “rompe” al GLP-1 en el penúltimo residuo de alanina para producir un producto NH₂-terminal truncado incapaz de estimular la liberación de insulina a través del receptor GLP-1 (Mentlein *et al.*, 1993; Kieffer *et al.*, 1995). La vida media de GLP-1 intacto evaluado después de la administración exógena de péptidos es menor a 2

minutos en los roedores (Kieffer *et al.*, 1995), en seres humanos normales y diabéticos (Deacon *et al.*, 1995).

2.4.4 Acción del GLP-1 y receptor del GLP-1 (GLP-1R)

El GLP-1 potencia la secreción de insulina estimulada por glucosa y mejora la biosíntesis de insulina a través de la inducción de la expresión del gen de insulina (Drucker *et al.*, 1987, Fehmann *et al.*, 1992). GLP-1 también estimula la somatostatina e inhibe la secreción de glucagón (Orskov *et al.*, 1988). La activación del GLP-1R aumenta la masa de células a través de la estimulación de la proliferación y la neogénesis y la inhibición de la apoptosis de las células β (Drucker 2003, Li *et al.*, 2003). El GLP-1 ejerce estos efectos a través de un GPCR, un miembro de la familia de receptores glucagón-secretina (Thorens *et al.*, 1993) que se expresa ampliamente en los islotes pancreáticos, cerebro, corazón, riñón y tracto gastrointestinal (Thorens *et al.*, 1993; Campos *et al.*, 1994). Hasta la fecha sólo se ha identificado un GLP-1R que traduce la señal proveniente del acoplamiento con el GLP-1 y que tiene efecto en el control de la homeostasis de la glucosa. Curiosamente, se ha reportado que el GLP-1 mejora la sensibilidad a la insulina y otras acciones en tejidos periféricos como el músculo, el hígado y la grasa. Por lo tanto, la presencia funcional de los receptores de GLP-1 con diferentes propiedades de señalización en los tejidos periféricos como el músculo, la grasa y el hígado sigue siendo poco conocida.

El GLP-1 estimula la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C con la consiguiente activación de cAMP-dependiente de la proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa C (PKC) que conduce a un aumento del calcio citosólico en líneas celulares del páncreas (Drucker *et al.*, 1987, Holz *et al.*, 1995). El GLP-1 aumenta la transcripción de genes de la insulina de una manera independiente de PKA (Skoglund *et al.*, 2000). También se ha podido demostrar el papel que juega el cAMP y los factores de intercambio del nucleótido guanina (GEFs) en la señalización

de cascada del GLP-1R en las células β y, más concretamente para el cAMP GEF II (Kang *et al.*, 2001, Kashima *et al.*, 2001).

GLP-1 estimula la expresión génica de la insulina a través la activación del factor nuclear de células-T activadas (NFAT) (Lawrence *et al.*, 2002) y la activación de ERK a través de un mecanismo dependiente de MEK, pero independiente de Raf y Ras (factores de transcripción génica) (Gomez *et al.*, 2002).

La observación de que el GLP-1 estimula la proliferación y promueve la supervivencia de las células β ha generado mucho interés en el potencial terapéutico de los agonistas de GLP-1R para mejorar la masa de células β en diabetes. GLP-1 incrementa: la proliferación celular, fosfoinositol-3-quinasa y PDX-1 en las líneas de células de los islotes a través del factor de crecimiento epidérmico (Buteau *et al.*, 1999, Buteau *et al.*, 2001, Buteau *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2005). Los agonistas de GLP-1R también inducen la diferenciación de las células exocrinas del páncreas en un fenotipo endocrino, como lo demuestra el aumento de expresión de genes específicos de las células β y el desarrollo de la secreción de insulina estimulada por glucosa (Zhou *et al.*, 1999).

2.4.4.1 Acciones extrapancreáticas del GLP-1.

El GLP-1 inhibe el vaciamiento gástrico y aumenta la saciedad, lo que lleva a la pérdida de peso tras el tratamiento crónico con agonistas de GLP-1R (Kinzing *et al.*, 2002). Receptores GLP-1 se han localizado en varias regiones del cerebro, incluyendo el hipotálamo, que se sabe regulan la homeostasis energética (Shughrue *et al.*, 1996). Barragan *et al.* (1994) demostraron que el GLP-1 ejerce efectos sobre el corazón en roedores, ellos demostraron que el GLP-1 o la exendina-4 aumenta la presión arterial y frecuencia cardíaca en ratas, y Bose *et al.* (2005) demostraron que la activación de GLP-1R protege directamente al corazón contra el daño por isquemia/reperfusión en ratas Por el contrario, Gross *et al.* (2003) demostraron que GLP-1R en

ratones mutantes muestran al final de la diástole ventricular izquierda elevada presión y aumento del grosor de sus paredes. También se ha demostrado que la señalización de GLP-1 puede modificar el aprendizaje y mejorar la neuroprotección en los roedores (During *et al.*, 2003).

La importancia fisiológica del GLP-1 se ha examinado usando antagonistas para GLP-1R, tales como la exendina-9-39 y GLP-1R de ratones mutantes. La administración de la exendina-9-39 en ratas reduce la secreción de insulina y aumentan el vaciado gástrico y los niveles plasmáticos de glucagón, lo que lleva al incremento de la glucemia después de la ingesta de glucosa. Estos resultados ilustran la importancia fisiológica de GLP-1 para el control de la liberación de hormonas de los islotes, la motilidad gastrointestinal y la homeostasis glucostática (Schirra *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 1999; Schirra *et al.*, 2006). Del mismo modo, ratones mutantes (GLP-1R) muestran leve hiperglucemia en ayunas e intolerancia a la glucosa después de la administración de glucosa oral o intraperitoneal, en asociación con defectos en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Scrocchi *et al.*, 1996). Además, los ratones GLP-1R/- muestran una reducción en el número de islotes grandes y defectos en la regeneración de la masa de las células β después de la pancreatectomía parcial, y una mayor susceptibilidad a la apoptosis de las células β después de la administración de estreptozotocina (Ling *et al.*, 2001; De Leon *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003). Por lo tanto, GLP-1 endógeno es esencial para función de las células β y la respuesta adaptativa de los islotes ante la injuria experimental.

2.4.4.2 Acción del GLP-1 sobre el sistema nervioso central

La observación inicial de que la remoción de la glucosa y los niveles de insulina fueron significativamente mayores después de la administración oral de glucosa en comparación con la misma cantidad pero administrada por vía intravenosa da lugar a postular que la homeostasis de la glucosa está parcialmente controlada por las hormonas peptídicas derivadas del intestino (McIntyre *et al.*, 2005). De hecho, se ha establecido que este "efecto incretina" está mediada por

la secreción postprandial de las hormonas incretinas, tales como péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) (Drucker *et al.*, 2006).

El GLP-1 es una potente hormona secretada por las células L de los intestinos (Varndell *et al.*, 1985) y por poblaciones discretas de neuronas (Jin *et al.*, 2004). Tradicionalmente, esta hormona intestinal se cree que regula la homeostasis de la glucosa a través de acción directa sobre las células β para estimular la secreción y la biosíntesis de insulina, disminución de la secreción de glucagón y promover en el páncreas el crecimiento de las células β (Drucker, 2006). La acción del GLP-1 a nivel central ha sido asociada con el control de la ingesta de alimentos (Turton *et al.*, 1996). Sin embargo, los estudios emergentes están apuntando a la regulación de GLP-1 en la homeostasis de la glucosa periférica a través de la acción directa sobre el sistema nervioso central. En la utilización vía endovenosa de antagonistas o agonistas del GLP-1, se encontró que su acción sobre el sistema nervioso central está implicado en la señalización de la regulación de la secreción periférica de insulina y en la disponibilidad para la utilización de glucosa, que en conjunto aumenta el almacenamiento de glucógeno hepático, en respuesta a un siguiente ayuno (Knauf *et al.*, 1964).

El mRNA del GLP-1R está presente ampliamente en el cerebro, incluyendo en el hipocampo, en los núcleos del hipotálamo tales como el arcuato (ARC) y paraventricular (PVN), y en el cerebro posterior (Merchenthaler *et al.*, 1999). De estos sitios, se sabe que en el PVN y rombencéfalo median el efecto anorexigénico del GLP-1 en el SNC (Grill *et al.*, 1988; Turton *et al.*, 1996; McMahon y Wellman, 1998). Curiosamente, a pesar de que los receptores de GLP-1 se encuentran en el ARC, este no regula la ingesta de alimentos. La administración de GLP-1 en el ARC reduce eficazmente la producción de glucosa hepática, un evento no reproducible con la administración de GLP-1 en el PVN.

A pesar de que aún no se han aclarado la activación del sistema GLP-1 en el SNC y su forma de regular la homeostasis de la glucosa, la activación de los canales de K^+ dependiente de

ATP(K_{ATP}) representa un posible candidato, pues la administración de bloqueadores de los canales K_{ATP} impidió la supresión de GLP-1 inducida por la producción de glucosa. Además, el efecto supresor del GLP-1 central por la glucosa parece estar mediado por POMC ya que los receptores de GLP-1 en gran parte están colocalizados en el POMC y no en las neuronas del NPY/AgRP en el ARC (Sandoval *et al.*, 2008).

2.4.5 GLP-1 y el balance energético

El GLP-1, un producto de los genes del proglucagón (GCG), es secretada a la circulación portal hepática a partir de células L intestinal en respuesta a la ingestión de nutrientes (Baggio y Drucker, 2007; Holst, 2007,). Numerosos factores han sido implicados en la regulación de la secreción de GLP-1, incluyendo nutrientes y fibra dietética, señalización neuronal intestinal de proximal a distal, neurotransmisores y otras hormonas gastrointestinales, receptores acoplados a proteína G activados por ácidos grasos libres, así como los receptores de gusto en las células L.

El GLP-1 es quizás la incretina de mayor efecto para estimular la secreción de insulina de las células β del páncreas (Baggio y Drucker, 2007; Holst, 2007). Además de ser producidas por las células L intestinales; el GLP-1 también es producido por el núcleo caudal del tracto solitario y en el núcleo ventrolateral del hipotálamo (Merchenthaler *et al.*, 1999), y los receptores de GLP-1 (GLP-1R) se expresan en el cerebro posterior y en los núcleos del hipotálamo los cuales se encargan de regular el balance energético (Göke *et al.*, 1995).

2.4.5.1 Balance energético por acción del GLP-1 a nivel central

La evidencia sobre el papel del GLP-1 en la regulación del balance energético fue reportada por primera vez en 1996, pues su administración a nivel central causa la inhibición de

la ingesta de alimentos sólidos en las ratas (Tang-Christensen, 1996; Turton, 1996), siendo este efecto a corto plazo (1-2 h). Además, el efecto anorexígeno de GLP-1 parece estar mediado principalmente a través del GLP-1R central, pues la administración periférica de GLP-1 ejerce poco o ningún efecto sobre la ingesta de alimentos (Navarro, 1996). GLP-1 también participa el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) en ratas (Larsen *et al.*, 1997) y la actividad del GLP-1R en el núcleo paraventricular y el núcleo central de la amígdala es necesaria para mediar respuestas neuroendocrinas y de comportamiento ante los factores estresantes interoceptivos y psicógena (Kinzig *et al.*, 2002; Kinzig, 2003). A su vez, los factores de estrés fisiológico, así como los glucocorticoides se modulan por la transcripción de GCG en la parte posterior del cerebro (Zhanget *al.*, 2009). En los roedores, la actividad del sistema nervioso simpático es necesaria para mediar varios efectos del GLP-1R a nivel central, incluyendo la inhibición del vaciado gástrico, la inhibición de la adipogénesis y la hiperglucemia inducida por exendina (Nakade *et al.*, 2006; Nogueiras, 2009; Pérez-Tilve, 2010). Finalmente, la actividad del GLP-1R central es la de regular la homeostasis de la glucosa, específicamente por la detección de glucosa a nivel intestinal, estimulando la secreción de insulina, modulando el metabolismo de glucosa en el músculo e hígado, posiblemente por redistribución del flujo sanguíneo periférico (Knauf, 2005; Cabou, 2008; Knauf, 2008; Sandoval *et al.*, 2008).

2.4.5.2 Balance energético por acción del GLP-1 a nivel periférico

Inicialmente se describió como posible rol central del GLP-1 la señal de saciedad; lo cual se basó principalmente en los informes sobre la consiguiente anorexia después de la administración central de GLP-1 versus una anorexia leve tras la administración periférica de GLP-1 (Tang-Christensen, 1996; Turton, 1996; Navarro, 1996). Esta hipótesis fue apoyada por el conocimiento que GCG y GLP-1R son expresados en áreas clave del sistema nervioso central

conocidos por su rol de regular la ingesta de los alimentos (Shimizu, *et al.*, 1987; Shughrue *et al.*, 1996; Merchenthaler *et al.*, 1999). Además, el hecho de que el GLP-1 circulante se degrada rápidamente por la enzima dipetidyl peptidasa-4 (DPP-4) fue el factor desfavorable en la activación central de GLP-1R por el GLP-1 periférico (Mentlein *et al.*, 1993).

Sin embargo, informes sobre la anorexia marcada en ratas después de la administración periférica de exendina sugiere la posibilidad de que GLP-1 periférico puede reducir la ingesta de alimentos, a través de la activación de GLP-1R periféricos (Rodríguez de Fonseca, 2000; Szayna, 2000). No obstante, estos resultados fueron fácilmente explicados por la mayor estabilidad de la exendina en la circulación, así como la capacidad de exendina en cruzar la barrera hematoencefálica en ratones (Thum, 2002; Kastin y Akerstrom, 2003). Por lo tanto, sigue siendo posible que la exendina periférica produzca la reducción de la ingesta a través de la activación directa de GLP-1R en el SNC.

En un estudio realizado en ratones donde la administración periférica de la albúmina conjugada con GLP-1 y la exendina, una modificación que impide que estos péptidos crucen la barrera hematoencefálica, redujo significativamente el consumo de alimentos en estos animales (Baggio *et al.*, 2004; Baggio *et al.*, 2008), lo que sugiere que estos efectos no dependen de la activación directa de GLP-1R en el SNC. Sin embargo, estos efectos podrían ser mediados a través GLP-1R que se encuentra en órganos circunventriculares al cerebro, tales como el área postrema y órgano subfornical (Göke *et al.*, 1995; Merchenthaler *et al.*, 1999). Un estudio pone en duda esta explicación, ya que los investigadores observaron una respuesta anoréxica intacta a la inyección intraperitoneal de exendina en ratas con lesiones de la zona postrema, órgano subfornical o ambos (Baraboi *et al.*, 2010). Sin embargo, este hallazgo no debe ser considerado como definitivo, ya que la dosis de exendina intraperitoneal utilizadas en estos estudios pueden haber sido lo suficientemente altas para activar GLP-1R central y provocar anorexia.

El trabajo de Williams y sus colegas en ratas tratadas con exendina proporcionan evidencia sustancial a favor de un mecanismo periférico de GLP-1 para inducir anorexia, así como el papel de GLP-1 periférico endógeno en la regulación de la ingesta de alimentos. En concreto, la administración intraperitoneal aguda de exendina aumenta la ingesta de alimentos, y el tratamiento previo con exendina intraperitoneal bloquea la anorexia en respuesta a una precarga de nutrientes, lo que indica que la saciedad inducida por nutrientes en parte mediada por el GLP-1 (Williams *et al.*, 2009).

2.4.5.3 Control energético por el GLP-1 a corto y largo plazo

Existe la hipótesis que GLP-1 regula la ingesta de alimentos sólo a corto plazo entre comidas. A pesar que este papel fue atribuido inicialmente al GLP-1 central, la evidencia demuestra que GLP-1 periférico actúa como un señalizador de saciedad derivado del intestino similar a la acción de CCK, que confirmaría que GLP-1 periférico permite la regulación a corto plazo del balance de energía. Sin embargo, GLP-1 periférico también puede interactuar con reguladores del balance energético a largo plazo como la leptina, lo que implica que jugaría un rol en la regulación del balance energético a corto y largo plazo (Barrera *et al.*, 2011).

Uno de los mecanismos propuestos por el cual la leptina reduce la ingesta de alimentos es mediante el aumento de la sensibilidad de señales periféricas de la saciedad. Confirmando esta hipótesis, se ha demostrado en ratones que la administración sub-umbral combinada de leptina y CCK, no reducen significativamente el consumo de alimentos cuando se administra de forma individual, reducen la ingesta de alimentos en un corto plazo, siendo este efecto bloqueado por cualquier capsaicina o por la CCK-A antagonista de los receptores devazepida (Barrachina *et al.*, 1997). Una respuesta anorexígena similar se ha observado con la coin fusión de leptina intracerebroventricular y CCK intraperitoneal en ratas (Emond *et al.*, 2006).

Williamset al. (2006) demostraron una relación similar entre la leptina y GLP-1 periférico. Primero, la administración intraperitoneal de dosis fijas de GLP-1 reduce a corto plazo el consumo de alimentos en ratones sanos pero no en obesos. En segundo lugar, la administración combinada a dosis subumbral de leptina intraperitoneal o intracerebroventricular con GLP o exendina intraperitoneal reducen la ingesta de alimentos y el peso corporal. En tercer lugar, los efectos anoréxicos de GLP-1 y la exendina intraperitoneal son significativamente debilitados por el ayuno, pero restaurados por el reemplazo crónico de leptina subcutánea.

La evidencia de una relación entre el GLP-1 central y leptina se remontan a la década de los 90, cuando Goldstone informó de la presencia de los receptores de leptina en las neuronas GCG del cerebro posterior de ratón, así como anorexia inducida por leptina intracerebroventricular (Goldstone, *et al.*, 1997). Poco tiempo después, se reportó que la inyección intracerebroventricular de la leptina previene el ayuno inducido por la disminución de la expresión hipotalámica GLP-1 y del GCG en el cerebro posterior en ratas (Goldstone, 2000). En conjunto, estos datos sugieren que la leptina regula positivamente al GLP-1 central, y sugieren que el GLP-1 central a diferencia de otros neuropéptidos tiene una actividad crítica bajo la influencia de la leptina. Esta hipótesis proviene de la constatación de que las neuronas GCG del cerebro posterior en ratas se activan por la leptina. Por otra parte, la leptina despolariza directamente a las neuronas GCG del rombéncefalo del ratón (Elias, 2000; Hisadome *et al.*, 2010).

Sin embargo, aunque el bloqueo de la acción intracerebroventricular de leptina con exendina intracerebroventricular ha sido replicado en ratas (Nowak y Bojanowska, 2008), experimentos en ratones mutantes (GLP-1R) demostraron una respuesta anorexigénica normal por leptina exógena (Scrocchi *et al.*, 1997), lo que contrasta con el papel crítico de GLP-1 central tras su activación por leptina o sugiere el desarrollo de algún tipo de compensación.

Además, las discrepancias entre los efectos de la leptina en las neuronas GCG del cerebelo en ratones versus ratas han sido reportados. La leptina intraperitoneal induce la fosforilación de STAT3 en el ratón, pero no en neuronas GCG del cerebro posterior de ratas. Asimismo, la leptina intraperitoneal previene la disminución del ayuno inducida por la expresión de GCG en rombencéfalo de ratones pero no de ratas (Huo *et al.*, 2008). A pesar de estas discrepancias, se plantea la posibilidad de diferencias entre especies en la relación entre la leptina y GLP-1 central, es importante tener en cuenta que los ratones y las ratas se mantuvieron en ayunas por la misma cantidad de tiempo y fueron sacrificados en el mismo intervalo de tiempo después de la administración intraperitoneal de leptina en los estudios respectivos. Por lo tanto, las diferencias observadas entre especies puede ser un factor secundario a las diferencias en el impacto relativo de un ayuno de 24 horas y/o del tiempo de acción de la leptina en ratones en comparación con las ratas.

Las diferencias entre el efecto del ayuno sobre la expresión del GCG en el cerebro posterior en ratones frente a las ratas sugiere una interpretación alternativa de los datos. Debido a que un ayuno de 24 h probablemente resulta en una mayor pérdida de peso en los ratones en comparación con las ratas, tal vez la expresión de GCG en el cerebro posterior se asocie más con el estado de energía de todo el cuerpo que con el ayuno a corto plazo o el estado de alimentación. De hecho, esta hipótesis es apoyada por los trabajos de Vrang *et al.* (2008), quienes han informado sobre un incremento en la expresión significativa de GCG en el robencéfalo de ratas obesas en comparación con magras. Por otra parte, aunque no se reportó como una correlación significativa, si se notó una asociación positiva entre los niveles de expresión del ARNm del GCG del cerebro posterior y el peso corporal en ratas magras que estaban con restricción alimenticia, ad libitum o sobrealimentados.

Primeaux *et al.* (2010) han informado de una asociación muy similar entre la expresión de GCG intestinal y el peso corporal en las ratas resistentes a la obesidad y las propensas a la obesidad mantenidas con una dieta baja en grasa o sin grasa. En conjunto, estos datos sugieren que la expresión GCG tanto en cerebro posterior e intestino varía directamente con el peso corporal.

Por otro lado, la expresión de GCG no está muy asociada con el peso corporal, sino más bien con la adiposidad corporal. Knauf *et al.* (2008) han reportado una mayor expresión de GCG en el cerebro posterior en ratones alimentados con una dieta alta en contenido de grasa y baja en carbohidratos. Curiosamente, estos animales no presentaron diferencias significativas en el peso corporal que los grupos controles. Sin embargo, los datos sobre la condición corporal no fueron informados, por lo que el consumo de una dieta con alto contenido de grasa y baja en carbohidratos puede tener como resultado un mayor almacenamiento de tejido adiposo corporal, a pesar de una falta de aumento de peso. De la misma forma, se ha observado una correlación positiva significativa entre la expresión de GCG en el rombencéfalo y el peso corporal en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, lo que hace aún más fuerte la relación entre la expresión de GCG en el cerebro posterior y la adiposidad corporal (Barrera, 2011); datos que en conjunto apoyan la hipótesis de que la expresión de GCG en el cerebro posterior e intestinal varía directamente con el tamaño de los almacenes periféricos del tejido adiposo, curiosamente, esta relación puede existir independientemente de la leptina.

2.4.6 Relación del GLP-1 con la obesidad y la pérdida de peso

La evidencia que la expresión de GCG centrales y periféricos varía en proporción directa al almacenamiento de tejido adiposo corporal, incrementa la posibilidad de que la fisiología del GLP-1 se vea alterada en estados de obesidad. Sin embargo, poco se sabe acerca de la naturaleza

de estos cambios, ya que no es posible interpretar los niveles de expresión génica de GCG como un sustituto de la actividad del sistema del GLP 1.

El GLP-1R en ratones mutantes no mostró diferencias entre la ingesta de alimentos “normal” y el peso corporal y la hiperfagia y el aumento de peso inducidas por una dieta alta en grasas en comparación con ratones normales (Scrocchi, 1996; Scrocchi y Drucker, 1998). Sin embargo, otros experimentos demostraron que ratones mutantes muestran posteriormente un desbalance hipermetabólico, con aumento en la ingesta de alimentos, en el gasto de energía durante la actividad, pero una respuesta normal ante una dieta alta en grasas (Hansotia, 2007).

Considerando que los resultados actuales sobre los modelos colectivos de ratón indican poco o ningún efecto global de GLP-1 en la pérdida del peso corporal o en la sensibilidad a la obesidad inducida por dieta, los modelos de rata muestran un “cuadro” distinto. Es así, que se informó de hiperfagia sostenida y aumento del peso en respuesta a las repetidas inyecciones diarias de exendina a nivel intracerebroventricular, lo que sugiere que la actividad central de GLP-1R inhibe la ingesta de alimentos y el aumento de peso (Meeran, 1999). Estos hallazgos han sido confirmados en otros estudios donde la hiperfagia así como el aumento de la ganancia de peso y la adiposidad, se muestra en la respuesta a la infusión crónica intracerebroventricular de exendina (Barrera, 2011). Esta respuesta anabólica no fue significativamente diferente en ratas alimentadas con comida estándar o con una dieta alta en grasas, lo que sugiere que la actividad GLP-1R central no se ve alterada por la obesidad o por el exceso de ingesta de grasa. Sin embargo, Vrang (2008) informó de una mayor sensibilidad a los efectos hiperfágicos tras la administración intracerebroventricular de exendina en ratas obesas en comparación con ratas magras, lo que sugiere que la obesidad está asociada con una mayor actividad del GLP-1R central.

Una tercera posibilidad es que la obesidad está asociada con "la resistencia al GLP-1 en el SNC", una hipótesis planteada por el trabajo de Al-Barazanji et al. (2000), donde el efecto anorexígeno de la administración centralizada de exendina es menor en obesos frente a ratas magras. Entonces, la obesidad puede estar asociada con problemas en la secreción de GLP-1, asociado a las células L en ratones y corroborado por varios estudios que reportan disminución plasmática y de secreción de GLP-1 en individuos con obesidad (Ranganath, 1996; Vilsboll et al., 2001; Anini y Brubaker, 2003; Vilsboll, 2003; Muscelli, 2008; Carr, 2010).

Las especulaciones del papel de GLP-1 en el tratamiento de la obesidad está en curso desde que se descubrió que la administración central de GLP-1 reduce la ingesta de alimentos en ratas (Tang-Christensen, 1996; Turton, 1996). Aunque los estudios iniciales que emplean la administración intracerebroventricular crónica o repetitiva de GLP-1 en ratas produjeron resultados variables con respecto a la permanente anorexia y pérdida de peso (Donahey et al., 1998; Meeran, 1999), estudios de toxicidad crónica con el agonista exendina, de acción prolongada sobre GLP-1R, han sido muy prometedores.

En conjunto, los datos actuales apoyan un modelo mediante el cual el GLP-1 periférico y central se combinan para regular finalmente el equilibrio energético a corto y largo plazo. En base a alimentos determinados, los nutrientes intraluminales estimulan a las células intestinales L para secretar GLP-1, que actúan localmente a través del GLP-1R expresado en terminales nerviosas aferentes vagales intestinales para iniciar la retroalimentación a los núcleos claves del cerebro posterior, tales como el núcleo caudal del tracto solitario. Estos núcleos del cerebro posterior integran una variedad de señales relacionadas a la ingesta de alimento que incluyen niveles plasmáticos de GLP-1 y la distensión gástrica y, a su vez, modulan la neurotransmisión eferente para promover la saciedad.

En el cerebro posterior las neuronas GCG y el GLP-1R participan en este circuito de retroalimentación, tal vez específicamente como mediadores de la saciedad inducida por la distensión gástrica, sin embargo, también puede integrar señales iniciadas por el GLP-1 periférico. Además, la leptina aumenta los efectos de saciedad del GLP-1 periférico y central, quizás a través de la estimulación directa de la secreción del GLP-1 o indirecta por la modulación de su acción sobre sus receptores neuronales (Barrera et al., 2011).

Considerando que tanto a nivel central y periférico el GLP-1 regula a corto plazo el balance de energía a través de un circuito de retroalimentación intestino-cerebro posterior, el GLP-1 central también regula a largo plazo el balance de energía, como lo demuestran los estudios donde hubo pérdida de la función de GCG-expresado en neuronas en el núcleo caudal del tracto solitario y la actividad del GLP-1R central. Además, el GLP-1 central actúa como un mediador de la acción de la leptina central, que es potencialmente un mecanismo por el cual el GLP-1 central regula la adiposidad corporal total. Por último, la actividad central del GLP-1 está alterada en la obesidad y se caracteriza por deterioro en la secreción del GLP-1. Esta hipótesis es coherente no sólo con los datos que demuestran la disminución de los niveles de GLP-1 que circulan en los seres humanos con obesidad, sino también con el hecho de que los agonistas GLP-1R conservan su eficacia en estos individuos (Barrera et al., 2011).

2.5 Tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en camélidos sudamericanos

Un estudio realizado por Firshman et al., 2013, determina que los camélidos sudamericanos tienen una baja secreción de insulina inducida por glucosa y una marcada resistencia a la insulina comparada con otras especies. Otro trabajo realizado por Cebra et al., 2005 demuestra que las crías de llama tienen una tolerancia a la glucosa y resistencia a la

insulina mayor a la de los adultos. Ueda J. *et al.* 2004, demuestra que los camélidos sudamericanos presentan la habilidad de mantener altas concentraciones de glucosa en sangre y atribuye que esto es debido a la baja concentración de insulina plasmática, lenta remoción de glucosa y parcial resistencia celular a la insulina en camélidos.

III. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en comunidades alpaqueras de los departamentos de Puno y Cuzco, a una altitud superior a los 3800 metros sobre el nivel del mar; que permitieron obtener animales mantenidos bajo las mismas condiciones de alimentación y manejo. El procesamiento de muestras y resultados se realizó en el Laboratorio de Fisiología Animal FMV-UNMSM en el departamento de Lima.

3.2 Animales

Se utilizaron 36 crías de alpacas de 0 (menores a 24h de nacidos) a 45 días de edad y adultos procedentes de las comunidades alpaqueras ya mencionadas. El procedimiento experimental se realizó en animales aparentemente sanos y fueron distribuidos en grupos etarios de acuerdo a su edad:

Edad (días)	0	1-7	8-15	16-21	27-34	35-45	Adultos
N° animales	3	6	6	8	8	5	3

La edad de los animales se confirmó con los registros zootécnicos proporcionados por los dueños de los animales de las comunidades alpaqueras. Todos los animales fueron animales considerados de descarte por los comuneros y destinados al consumo humano.

3.3 Materiales

3.3.1 Material para la recolección de muestras

- Frascos de plásticos con tapa rosca de 50mL de capacidad.
- Formol tamponado al 10%.
- Hojas de afeitar.
- Estuche de disección.
- Cinta adhesiva de 2”.
- Cuchillos.
- Jeringas descartables de 20mL.
- Gasa.
- Algodón.
- Costótomo.
- Pentobarbital sódico al 6,5% (Halatal).

3.3.2 Equipos y materiales para el procesamiento de muestras mediante inmunohistoquímica.

3.3.2.1 Sustancias, reactivos y colorantes:

- Xilol.
- Alcohol de 70°, 80°, 90°, 96° y 100°.

- Parafina.
- Agua destilada con un pH de 7,1.
- Metanol.
- Peróxido de hidrógeno.
- Solución salina buffer fosfato (PBS).
- Solución buffer citrato, pH 6.0.
- Albúmina sérica bovina (BSA) al 1%.
- Albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1%.
- Hematoxilina de Harris
- Kit ABC de conejo (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)
- Anticuerpo primario anti-GLP-1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- 3'3 Diaminobenzidina (DAB) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)
- Poly-L-lisina (Sigma Aldrich, USA)

3.3.2.2 Equipos de laboratorio:

- Estufa.
- Equipo de procesamiento de muestras.
- Horno microondas.
- Micrótopo.
- Copas de coloración.
- Cubetas de coloración de plástico y vidrio.
- Moldes de parafina.

- Láminas cubreobjetos y portaobjetos.
- Microscopio trinocular con luz incorporada y cámara digital incorporada.
- Software AXIOVISION para cámaras Canon.
- Computadora.

3.4 Metodología

3.4.1 Sacrificio de los animales

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de solución anestésica de pentobarbital sódico al 6,5% vía vena yugular, previa inmovilización del animal, para luego proceder con el sangrado del animal.

3.4.2 Apertura del animal

Una vez sacrificado el animal, se colocó en posición decúbito dorsal y se realizó un corte a nivel de la línea media del abdomen desde la región xifoidea hacia la parte anterior del pubis; luego se seccionó la pared abdominal mediante dos cortes transversales, de la región umbilical hacia el lado derecho e izquierdo, respectivamente entre el arco costal y la protuberancia pélvica y se removió el omento mayor de su inserción natural.

3.4.3 Toma de muestras intestinales para inmunohistoquímica

Se tomaron muestras de entre 3 a 5 cm de longitud de la zona media de duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon (ascendente, transverso y descendente) las cuales fueron lavadas con formol tamponado al 10% en la zona de la luz intestinal, luego fueron colados en frascos de plástico conteniendo formol tamponado al 10% por un mínimo de 48 h, para luego ser transportados al Laboratorio de Fisiología Animal en la ciudad de Lima.

3.4.4 Procesamiento de muestras intestinales fijadas en formol

Las muestras fijadas fueron reducidas con ayuda de hojas de afeitar a un tamaño aproximado de 0,5 cm de longitud conservando la forma circular del intestino para luego ser colocadas en cápsulas debidamente identificadas procediendo al lavado con agua corriente

durante 6 horas, luego fueron colocados en el equipo de procesamiento de muestras para parafinado (ANEXO I).

3.5 Determinación del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) mediante inmunohistoquímica

Las muestras una vez procesadas fueron incluidas en parafina, para luego ser cortadas a un grosor de 5µm y colocadas en láminas portaobjetos embebidas en Poly-L-lysina (láminas positivadas). Las láminas fueron sometidas a desparafinado e hidratación (ANEXO II). Luego de la cual se realizó la inmunohistoquímica (ANEXO III), haciendo uso el anticuerpo primario monoclonal de ratón antiGLP-1(sc-73508, Santa Cruz Biotechnology).

Como controles positivos se utilizó íleon y colon ascendente de ratón y como control negativo se utilizaron las mismas muestras en las cuales se reemplazó el anticuerpo primario por BSA 0.1%.

Para finalizar se realizó el proceso de deshidratación y montaje (ver anexo), para luego observar las láminas al microscopio

3.6 Análisis de Imágenes

Las imágenes se capturaron con un microscopio trinocular (modelo Primo Star) para exámenes en campo claro en luz transmitida con un ocular WF 10x/20, objetivos de, 40X y 100X, y con una cámara digital Canon Powershot G9 de 12 megapíxeles montada sobre el microscopio y conectada con una computadora de alto rendimiento (Intel Pentium Dual Core).

El estudio consistió en la marcación específica de las células L productoras de GLP-1 en el eje cripta vellosidad, las cuales se observaron de color marrón dorado, de forma similar a una “gota de agua”.

Las células positivas fueron contadas en cada muestra, seleccionando 15 ejes cripta-vellosidad al azar, por corte intestinal, para todas las porciones intestinales (Zanuzzi *et al.*, 2010).

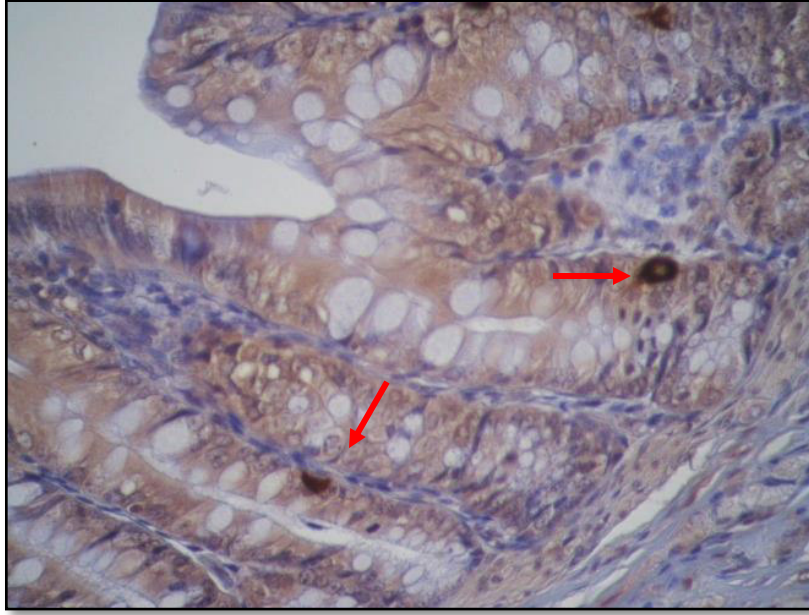


FIGURA 1. Célula L (productora de GLP-1) ubicada en la cripta de Lieberkühn de la mucosa intestinal de colon de alpaca, de 18 días de edad, mediante inmunohistoquímica y contrastada con hematoxilina de Harris, 400x.

3.7 Análisis estadístico

Se utilizó análisis de varianza de un factor, con un nivel de confianza del 95%, para determinar las diferencias entre los valores del número de células entre las diferentes porciones intestinales y las diferentes edades.

IV. RESULTADOS

Se determinó la presencia de células L (productoras de GLP-1) en crías de alpaca, desde el nacimiento hasta los 45 días de edad, así como en adultos de la misma especie, en duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon (Figura 1,2,3,4,5 y 6).

Respecto a los grupos etarios, se observa que en el grupo de recién nacidos, el yeyuno es la porción que contiene más células L (productoras de GLP-1) (Figura 3); mientras que en los demás grupos son el yeyuno e íleon.

Respecto a la ubicación, en el duodeno se aprecia un aumento de células L a partir de los 8 días en adelante. En el yeyuno, el mayor número se encuentra en los recién nacidos; en el íleon (Figura 3), entre los 8 a 45 días de edad, mientras que en el ciego y en el colon, el mayor número se observa en el grupo de animales adultos.

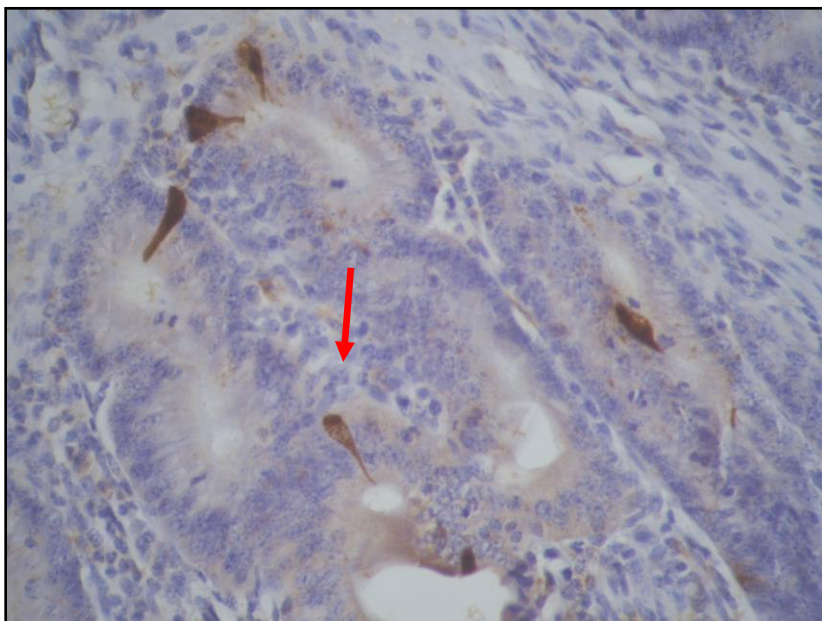


FIGURA 2.Célula L (productora de GLP-1) ubicada en la cripta de Lieberkühn de la mucosa intestinal del yeyuno de alpaca, de 21 días de edad, mediante inmunohistoquímica y contrastada con hematoxilina de Harris, 400x.

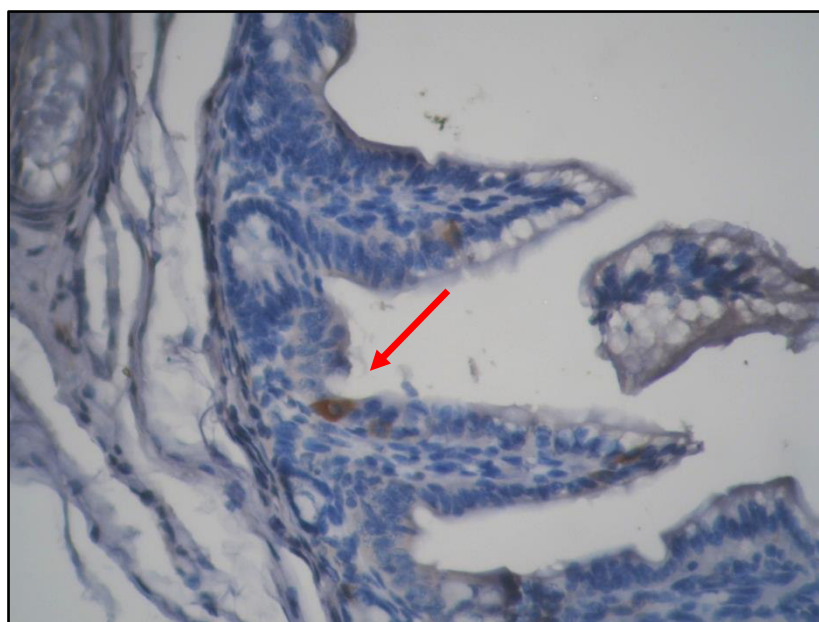


FIGURA 3.Célula L (productora de GLP-1) ubicada en la cripta de Lieberkühn de la mucosa intestinal del yeyuno de alpaca, de 1 día de edad, mediante inmunohistoquímica y contrastada con hematoxilina de Harris, 400x.

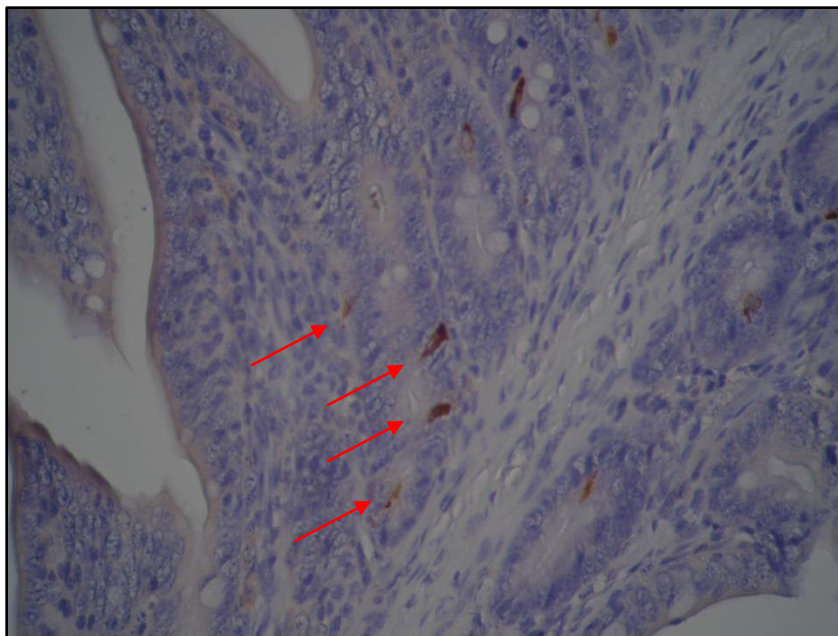


FIGURA 4. Célula L (productora de GLP-1) ubicada en la zona apical de la vellosidad del yeyuno de alpaca, de 5 días de edad, mediante inmunohistoquímica y contrastada con hematoxilina de Harris, 400x

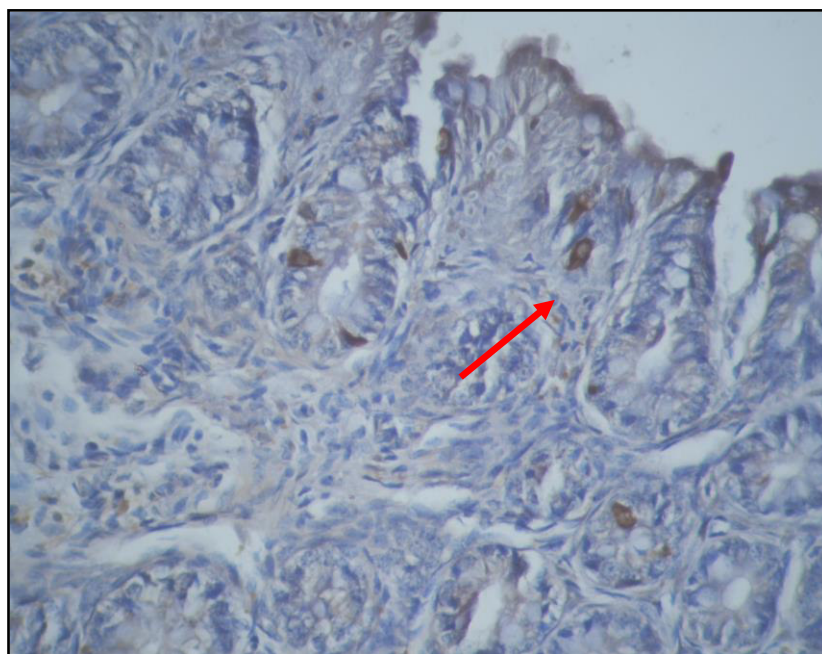


FIGURA 5. Célula L (productora de GLP-1) ubicada en la zona apical de la vellosidad del colon de alpaca, de un recién nacido, mediante inmunohistoquímica y contrastada con hematoxilina de Harris, 400x.

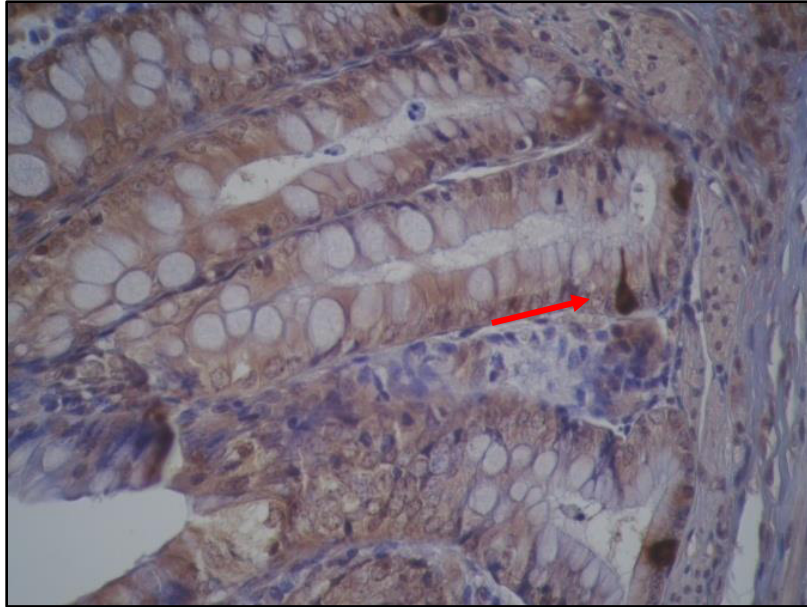


FIGURA 6. Célula L (productora de GLP-1) ubicada en la zona apical de la vellosidad del colon de alpaca, de 18 días de edad, mediante inmunohistoquímica y contrastada con hematoxilina de Harris, 400x.

Cuadro 1. Número de células L en intestino de alpacas (células L/eje cripta vellosidad)
expresados en $X \pm DS$. ANOVA DE UN FACTOR

EDAD	DUODENO	YEYUNO	ILEON	CIEGO	COLON ASCENDENTE
RECIEN NACIDOS	0.63 ± 0.71^{a1}	1.73 ± 0.64^{b1}	0.67 ± 0.72^{a1}	0.53 ± 0.64^{a1}	0.47 ± 0.51^{a1}
1-7 DIAS	0.66 ± 0.56^{a1}	1.28 ± 0.63^{b23}	1.23 ± 0.58^{b2}	0.39 ± 0.49^{c1}	0.58 ± 0.59^{a12}
8-15 DIAS	0.96 ± 0.45^{a23}	1.17 ± 0.46^{a3}	1.71 ± 0.88^{b3}	0.49 ± 0.59^{c1}	0.6 ± 0.49^{c12}
16-21 DIAS	0.85 ± 0.48^{a12}	1.23 ± 0.48^{b23}	1.34 ± 0.50^{b23}	0.43 ± 0.54^{c1}	0.75 ± 0.69^{a12}
27-34 DIAS	1.01 ± 0.45^{a23}	1.34 ± 0.60^{b23}	1.45 ± 0.65^{b23}	0.54 ± 0.57^{c1}	0.82 ± 0.58^{a2}
35-45 DIAS	0.95 ± 0.45^{a23}	1.45 ± 0.62^{b2}	1.75 ± 0.74^{c3}	0.47 ± 0.57^{d1}	0.84 ± 0.68^{a2}
ADULTOS	1.17 ± 0.87^{a3}	1.24 ± 0.44^{a23}	1.3 ± 0.47^{a2}	0.6 ± 0.62^{b1}	1.2 ± 0.61^{a3}

a,b,c: Comparación por porción intestinal(letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa)

1, 2,3: Comparación por grupos etarios (números distintos indican diferencia estadísticamente significativa)

V. DISCUSIÓN

Las células L, productoras de la hormona intestinal GLP-1, tienen por función sensor el ingreso de algunos nutrientes y secretar GLP-1 para mantener la homeostasis energética directa o indirectamente. La forma directa es a través de su accionar en el centro del apetito, ocasionando la saciedad, disminuyendo la motilidad gástrica; mientras que la forma indirecta es a través de su acción sobre las células Beta pancreáticas, estimulando la secreción de insulina e incrementando la proliferación celular (Stoffers *et al.*, 2000; Rolin *et al.*, 2002). Todos estos mecanismos mencionados son importantes en las diferentes etapas de vida en los mamíferos, en especial en neonatos, donde una descompensación de los mecanismos de la homeostasis energética, podría devenir en la susceptibilidad del animal a padecer enfermedades. Pues, el GLP-1 tiene como función importante estimular la secreción de insulina (Bayon *et al.*, 2010), y esta a su vez permite tener reservas energéticas (Cunningham, 2009), la cual es importante por las altas demandas energéticas de la cría de alpaca (Cid, 2010). De allí, que en nuestro estudio el hallazgo de este tipo celular desde el nacimiento hasta la etapa adulta (cuadro 1) permite establecer que el rol de la homeostasis energética es regulado también por las células L, como sucede en otras especies donde también se ha podido evidenciar la presencia de estas células (Eissele *et al.*, 1992), sin embargo, estos hallazgos no nos permiten esclarecer los niveles altos de glucosa sanguínea que presentan las alpacas principalmente en los primeros meses de vida

Las alpacas en la etapa de lactación obtienen su fuente de energía (glucosa) de la leche que consumen, para luego adicionar a su dieta las pasturas que ingieren a partir de pocos días después de nacer. Estos alimentos fibrosos no serán digeridos totalmente hasta que el individuo no tenga un estómago con compartimentos totalmente maduros y con capacidad de convertir los pastos en ácidos grasos volátiles; sin embargo, esta fibra pasará hacia el ciego y colon donde por acción bacteriana se convertirán en ácidos grasos de cadena corta, estas sustancias tienen una gran capacidad de ser absorbidas en el yeyuno e íleon (mayor número de células L en el presente estudio, (cuadro 1) y de allí pasar a circulación sistémica, donde llegarán al hígado para almacenarse, y cuando el organismo lo requiera convertirse en glucosa como fuente de energía para el individuo. Además, estos ácidos de cadena corta al interactuar con sus receptores en la célula L intestinal, desencadenan una cascada intracelular que conlleva a la producción y secreción del GLP-1, el cual como se mencionó modulará parte del metabolismo energético del individuo (Reimer y McBurney, 1996; Tolhurst *et al.*, 2012).

Así como en otros mamíferos, en el presente estudio se demuestra la presencia de células L en intestino de alpacas desde su nacimiento. Observando que en crías de alpaca, el mayor número de éstas fueron identificadas principalmente en yeyuno e íleon (porciones distales del intestino delgado) y colon (Cuadro 1). En otros estudios donde se evalúan las células L, las porciones usadas son las del intestino distal, ya que en estas es donde se encuentran en mayor cantidad, como es el caso del íleon (Ritzel *et al.*, 1997) y colon (Cani *et al.*, 2007) de ratas; en el yeyuno e íleon de cerdos y humanos (Eissele *et al.*, 1992), y en íleon y yeyuno de cuyes lactantes (Anglas, 2012). La ubicación de estas células en porciones distales del intestino delgado o en el colon es debido a su fisiología. A nivel del lumen intestinal estas células detectarán la presencia de sustancias como carbohidratos (Margolskee *et al.* 2007), lípidos y péptidos (Hall *et al.* 2003) que no han sido absorbidos en las primeras porciones intestinales, al sentir estas sustancias, se activará a nivel intracelular el cAMP (Rozengurt y Sternini, 2007) el

cual desencadenará toda una cascada cuya finalidad será permitir la salida del calcio del retículo endoplasmático para que este movilice vesículas que contienen GLP-1 y serán secretados a sangre.

Así mismo los transportadores de glucosa SGLT-1 a nivel apical y GLUT-2 a nivel basolateral del enterocito permitirán el ingreso de glucosa, el cual formará ATP y este cerrará canales de K despolarizando la membrana celular y abriendo los canales de calcio para que este ingrese a la célula y permita la secreción de GLP-1; lo cual sería el mecanismo por el cual en alpacas se da la secreción de GLP-1, ya que estas cuentan con transportadores de glucosa desde el nacimiento (Rodríguez *et al.*, 2012). Además de estos mecanismos de secreción, existe otro mecanismo por el cual GLP-1 es secretado, éste se da por la acción colinérgica de las terminaciones nerviosas del vago, quien emiten anatómicamente fibras colinérgicas especialmente en las porciones del intestino delgado posterior y el colon (Abello *et al.*, 1994; Balks *et al.*, 1997), como por ejemplo en el íleon de cerdos (Hansen *et al.*, 2004).

La secreción de GLP-1 en la parte final del intestino delgado y colon, se debe a que el organismo trata de potenciar la homeostasis energética a partir de sustancias no absorbidas en las primeras porciones intestinales (Elliott *et al.*, 1993); además de permitir un mejor trabajo por el páncreas endocrino al estimular en él la secreción de insulina y el incremento de las células beta por acción del GLP-1 (Stoffers *et al.*, 2000; Rolin *et al.*, 2002).

VI. CONCLUSIONES

Las células L en alpacas se encuentran presentes desde el primer día de vida, lo que indicaría su actividad sobre la regulación de la glucemia en esta especie desde el nacimiento.

Yeyuno e íleon son las porciones intestinales que contienen el mayor número de células L en alpacas del presente estudio.

VII. RECOMENDACIONES

Establecer la presencia de receptores para GLP-1 en células β del páncreas y relacionar sobre la secreción de insulina en alpacas.

Hacer estudios sobre GLP-1 en diferentes porciones encefálicas de la alpaca para estudiar el rol sobre el apetito.

Hacer un estudio con etapas de vida más tempranas (fetos) para evaluar si nacen con desarrollo de células L.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Aaboe K. 2010. Twelve weeks treatment with the DPP-4 inhibitor, sitagliptin, prevents degradation of peptide YY and improves glucose and non-glucose induced insulin secretion in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes. Metab.* 12: 323-333.
2. Abello J, Ye F, Bosshard A, Bernard C, Cuber JC, Chayvialle JA. 1994. Stimulation of glucagon-like peptide-1 secretion by muscarinic agonist in a murine intestinal endocrine cell line. *Endocrinology* 134, 2011–2017.
3. Al-Barazanji KA, Arch JR, Buckingham RE, Tadayyon M. 2000. Central exendin-4 infusion reduces body weight without altering plasma leptin in (fa/fa) Zucker rats. *Obes. Res.* 8: 317-323.
4. Anglas JC. 2012. Identificación y evaluación de proteínas (SGLT1, GLUT2 y GLP1) que intervienen en la absorción intestinal y metabolismo de la glucosa en cobayos (*Cavia porcellus*) lactantes. Tesis Para Obtener el Título Profesional de Médico Veterinario. Lima-Perú. p. 60.
5. Anini Y, Brubaker PL. 2003. Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes* 52: 252-259.
6. Anini Y, Jarrousse C, Chariot J, Nagain C, Yanaihara N, Sasaki K, Bernad N, Le Nguyen D, Bataille D, Roze C. 2000. Oxyntomodulin inhibits pancreatic secretion through the nervous system in rats. *Pancreas* 20: 348-360.
7. Baggio LL, Drucker DJ. 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132: 2131-2157.

8. Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, and Drucker DJ. 2004. Oxyntomodulin and glucagon-like peptide-1 differentially regulate murine food intake and energy expenditure. *Gastroenterology* 127: 546-558.
9. Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, Drucker DJ. 2004. A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (albugon) mimics peptidergic activation of GLP-1 receptor-dependent pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis. *Diabetes* 53: 249-2500.
10. Baggio LL, Huang Q, Cao X, Drucker DJ. 2008. An albumin-exendin-4 conjugate engages central and peripheral circuits regulating murine energy and glucose homeostasis. *Gastroenterology* 134: 1137-1147.
11. Baldissera FG, Holst JJ, Knuhtsen S, Hilsted L, Nielsen OV. 1988. Oxyntomodulin (glicentin-(33-69)): pharmacokinetics, binding to liver cell membranes, effects on isolated perfused pig pancreas, and secretion from isolated perfused lower small intestine of pigs. *Regul Pept* 21: 151-166.
12. Balks HJ, Holst JJ, von zur M^uhlen A, Brabant G. 1997. Rapid oscillations in plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in humans: cholinergic control of GLP-1 secretion via muscarinic receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 786–790.
13. Baraboi ED, Smith P, Ferguson AV, Richard D. 2010. Lesions of area postrema and subfornical organ alter exendin-4-induced brain activation without preventing the hypophagic effect of the GLP-1 receptor agonist. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298: R1098-R1110.
14. Barrachina MD, Martínez V, Wang L, Wei JY, Taché Y. 1997. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94: 10455-10460.
15. Barragan JM, Rodriguez RE, Blazquez E. 1994. Changes in arterial blood pressure and heart rate induced by glucagon-like peptide-1-(7—36 amide) in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 266: E459-E466.
16. Barrera J, Sandoval D, D'Alessio D, Seeley R. 2011. GLP-1 and energy balance: an integrated model of short-term and long-term control. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7: 507-516.
17. Barrera J, Sandoval D, D'Alessio D, Seeley R. 2011. GLP-1 and energy balance: an integrated model of short-term and long-term control. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7: 507–516.
18. Barrera JG. 2011. Hyperphagia and increased fat accumulation in two models of chronic CNS glucagon-like Peptide-1 loss of function. *J. Neurosci.* 31: 3904-3913.

19. Bayón Claudia, Barriga Mercedes Araceli, Litwak León. 2010. Incretinas, incretinomiméticos, inhibidores de DPP IV. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo por la Sociedad de Endocrinología y Metabolismo* Vol 47 N°3
20. Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, Brand CL, Yellon DM. 2005. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* 54: 146-151.
21. Buddington R, Elnif J, Puchal-Gardiner A, Sangild P. 2001. Intestinal apical amino acid absorption during development of the pig. *Am J Physiol Regul Comp Integr Physiol* 280: R241-R247.
22. Buteau J, Foisy S, Joly E, Prentki M. 2003. Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic betacell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes* 52: 124-132.
23. Buteau J, Foisy S, Rhodes CJ, Carpenter L, Biden TJ, Prentki M. 2001. Protein kinase Czeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes* 50: 2237-2243.
24. Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M. 1999. Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia* 42: 856-864.
25. Cabou C. 2008. Brain glucagon-like peptide-1 regulates arterial blood flow, heart rate, and insulin sensitivity. *Diabetes* 57: 2577-2587.
26. Campos RV, Lee YC, Drucker DJ. 1994. Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide- 1 in the mouse. *Endocrinology* 134: 2156-2164.
27. Cani PD, Holst JJ, Drucker DJ, Delzenne NM, Thorens B, Burcelin R & Knauf C 2007. GLUT2 and the incretin receptors are involved in glucose-induced incretin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 276, 18–23.
28. Carr RD. 2010. Secretion and dipeptidyl peptidase-4-mediated metabolism of incretin hormones after a mixed meal or glucose ingestion in obese compared to lean, nondiabetic men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 872-878.
29. Cebra CK, Tornquist SJ. 2005. Evaluation of glucose tolerance and insulin sensitivity in llama crias. *Am J Vet Res.* 66(6):1013-7
30. Cid Vazquez 2010. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. Manual para estudiantes y profesionales de veterinaria. Editorial Complutense. Madrid. España. PP 81,82 y 144

31. Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Batterham RL, Park A, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. 2003. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4696-4701.
32. Collie NL, Zhu Z, Jordan S, Reeve JR Jr. 1997. Oxyntomodulin stimulates intestinal glucose uptake in rats. *Gastroenterology* 112: 1961-1970.
33. Cunningham J 2009. *Fisiologia Veterinaria*. Cuarta Edición. Editorial Elsevier .España. PP 450
34. Dakin CL, Gunn I, Small CJ, Edwards CM, Hay DL, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR. 2001. Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. *Endocrinology* 142: 4244-4250.
35. De Leon DD, Deng S, Madani R, Ahima RS, Drucker DJ, Stoffers DA. 2003. Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration following partial pancreatectomy. *Diabetes* 52: 365-371.
36. Deacon CF, Johnson AH, Holst JJ. 1995. Human colon produces fully processed glucagon-like peptide 1 (7–36) amide. *FEBS Letters* 372: 269-272.
37. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. 1995. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide 1 are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 44: 1126-1131.
38. Dhanvantari S, Seidah NG, Brubaker PL. 1996. Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucagon. *Mol Endocrinol* 10: 342-355.
39. Doege H, Bocianski A, Scheepers A, Axer H, Eckel J, Joost H. 2001. Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem J* 359: 443-449.
40. Donahey JC, Van Dijk G, Woods SC, Seeley RJ. 1998. Intraventricular GLP-1 reduces short- but not long-term food intake or body weight in lean and obese rats. *Brain Res.* 779: 75-83.
41. Drucker DJ, Ehrlich P, Asa SL, Brubaker PL. 1996. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7911-7916.
42. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. 1987. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3434-3438.

43. Drucker DJ. 2003. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation and apoptosis. *Mol Endocrinol* 17: 161-171.
44. Drucker DJ. 2006. The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3: 153-165.
45. Dube PE, Brubaker PL. 2004. Nutrient, neural and endocrine control of glucagon-like peptide secretion. *Horm Metab Res* 36: 755-760.
46. During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker DJ, Haile CN. 2003. Glucagonlike peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med* 9: 1173-1179.
47. Edwards CM, Todd JF, Mahmoudi M, Wang Z, Wang RM, Ghatei MA, Bloom SR. 1999. Glucagonlike peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39. *Diabetes* 48: 86-93.
48. Eisselle R, Goke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, Göke B. 1992. Glucagon-like peptide 1 in cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European Journal of Clinical Investigation* 22: 283-291.
49. Elias CF. 2000. Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 423: 261-281.
50. Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V. 1993. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide and glucose-dependent insulintropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol* 138: 159-166.
51. Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V. 1993. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide and glucose-dependent insulintropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol* 138: 159-166.
52. Emond M, Schwartz GJ, Ladenheim EE, Moran TH. 1999. Central leptin modulates behavioral and neural responsivity to CCK. *Am. J. Physiol.* 276 (2): R1545-R1549.
53. Esquerre C, Samaniego L, Navas M, Sánchez D. 1979. Variaciones metabólicas asociadas al crecimiento post natal de la alpaca. *Res XII Cong Per Química, Lima*.
54. Esquerre C, Samaniego L. 1976a. Ph a lo largo del tracto alimenticio de la alpaca adulta (Lama pacos). *Res I Cong Per Bioquím. Lima Abs 90*.
55. Esquerre C, Samaniengo L, Román M. 1976b. Estadio metabólicos en relación al desarrollo post natal de la alpaca (Lama pacos). *Res I Cong Per Bioquím. Lima Abs 92*.

56. Fehmann HC, Habener JF. 1992. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I (7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma _TC-1 cells. *Endocrinology* 130: 159-166.
57. Firshman A, Cebra C, Schanbacher B, Seaquist E. 2013. Evaluation of insulin secretion and action in New World camelids. *Am J Vet Res* Vol. 74, No. 1, Pages 96-101
58. Furuta M, Yano H, Zhou A, Rouille Y, Holst JJ, Carroll R, Ravazolla M, Orci L, Furuta H, Steiner DF. 1999. Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6646–6651.
59. Göke R, Larsen P, Mikkelsen J, Sheikh S. 1995. Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur. J. Neurosci.* 7: 2294–2300.
60. Goldstone AP. 1997. Leptin A interacts with glucagon-like peptide-1 neurons to reduce food intake and body weight in rodents. *FEBS Lett.* 415: 134-138.
61. Goldstone AP. 2000. Effect of leptin on hypothalamic GLP-1 peptide and brain-stem pre-proglucagon mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269: 331–335.
62. Gomez E, Pritchard C, Herbert TP. 2002. cAMPdependent protein kinase and Ca²⁺ influx through L-type voltage-gated calcium channels mediate Raf-independent activation of extracellular regulated kinase in response to glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 277: 48146-48151.
63. Grill HJ, Carmody JS, Sadacca L, Williams DL, Kaplan JM. 1988. Attenuation of lipopolysaccharide anorexia by antagonism of caudal brain stem but not forebrain GLP-1-R. *AmJ Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1190-R1193.
64. Gros R, You X, Baggio LL, Kabir MG, Sadi AM, Mungrue IN, Parker TG, Huang Q, Drucker DJ, Husain M. 2003. Cardiac function in mice lacking the glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* 144: 2242–2252.
65. Hall WL, Millward DJ, Long SJ, Morgan LM. 2003. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *Br J Nutr* 89, 239–248.
66. Hansen L, Lampert S, Mineo H, Holst J. 2004. Neural regulation of glucagon-like peptide-1 secretion in pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:939-947.
67. Hansotia, T. 2007. Extrapancreatic incretin receptors modulate glucose homeostasis, body weight, and energy expenditure. *J. Clin. Invest.* 117: 143-152.

68. Herrmann C, Goke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Goke B. 1995. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56: 117-126.
69. Hisadome K, Reimann F, Gribble FM, Trapp S. 2010. Leptin directly depolarizes proglucagon neurons in the nucleus tractus solitarius: electrical properties of glucagon-like peptide 1 neurons. *Diabetes* 59: 1890–1898.
70. Holst JJ. 2007. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol. Rev.* 87: 1409-1439.
71. Holz GG, Leech CA, Habener JF. 1995. Activation of a cAMP-regulated Ca^{2+} -signaling pathway in pancreatic b-cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. *J Biol Chem* 270: 17749-17757.
72. Huo L, Gamber KM, Grill HJ, Bjørbaek C. 2008. Divergent leptin signaling in proglucagon neurons of the nucleus of the solitary tract in mice and rats. *Endocrinology* 149: 492–497.
73. Iñiguez, L.C. & R. Alem. 1996. Role of camelids as means of transportation and exchange in the Andean region of Bolivia. *World Animal Review* 86: 12-21.
74. Jarrousse C, Audousset-Puech MP, Dubrasquet M, Niel H, Martinez J, Bataille D. 1985. Oxyntomodulin (glucagon-37) and its C-terminal octapeptide inhibit gastric acid secretion. *FEBS Lett* 188: 81-84.
75. Jarrousse C, Bataille D, Jeanrenaud B. 1984. A pure enteroglucagon, oxyntomodulin (glucagon 37), stimulates insulin release in perfused rat pancreas. *Endocrinology* 115: 102-105.
76. Jin SL, Han VK, Simmons JG, Towle AC, Lauder JM, Lund PK. 2004. Distribution of glucagon-like peptide-1, glucagon, and glicentin in the rat brain: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 271: 519–532.
77. Kang G, Chepurny OG, Holz GG. 2001. cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in INS-1 pancreatic beta-cells. *J Physiol* 536: 375–385.
78. Kashima Y, Miki T, Shibasaki T, Ozaki N, Miyazaki M, Yano H, Seino S. 2001. Critical role of cAMPGEFII/ Rim2 complex in incretin potentiated insulin secretion. *J Biol Chem* 276: 46046–46053.
79. Kastin AJ, Akerstrom V. 2003. Entry of exendin-4 into brain is rapid but may be limited at high doses. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27: 313–318.

80. Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA. 1995. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136: 3585–3596.
81. Kim JG, Baggio LL, Bridon DP, Castaigne JP, Robitaille MF, Jette L, Benquet C,, Drucker DJ. 2003. Development and characterization of a glucagon-like peptide 1-albumin conjugate: the ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor in vivo. *Diabetes* 52: 751–759.
82. Kinzig KP, D'Alessio DA, Seeley RJ. 2002. The diverse roles of specific GLP-1 receptors in the control of food intake and the response to visceral illness. *J. Neurosci* 22: 10470–10476.
83. Kinzig KP. 2003. CNS glucagon-like peptide-1 receptors mediate endocrine and anxiety responses to interoceptive and psychogenic stressors. *J. Neurosci.* 23: 6163–6170.
84. Kirkegaard P, Moody AJ, Holst JJ, Loud FB, Olsen PS, Christiansen J. 1982. Glicentin inhibits gastric acid secretion in the rat. *Nature* 297: 156–157.
85. Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E, Benhamed F, Grémeaux T, Drucker J, Kahn CR, Girard J, Tanti JF, Delzenne NM, Postic C. Burcelin R. 1964. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest* 115: 3554–3563.
86. Knauf C. 2005. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J. Clin. Invest.* 115, 3554–3563.
87. Knauf C. 2008. Brain glucagon-like peptide 1 signaling controls the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and reduces energy expenditure. *Endocrinology* 149: 4768–4777.
88. Knauf C. 2008. Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* 57: 2603–2612.
89. Larsen PJ, Tang-Christensen M, Jessop DS. 1997. Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* 138: 4445–4455.
90. Lawrence MC, Bhatt HS, Easom RA. 2002. NFAT regulates insulin gene promoter activity in response to synergistic pathways induced by glucose and glucagon-like peptide-1. *Diabetes* 51: 691–698.
91. Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ. 2003. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J Biol Chem* 278: 471-478.

92. Ling Z, Wu D, Zambre Y, Flamez D, Drucker DJ, Pipeleers DG, Schuit FC. 2001. Glucagon-like peptide 1 receptor signaling influences topography of islet cells in mice. *Virchows Arch* 438: 382–387.
93. Lira B, Cueva S, Rodríguez J, Ayón M, Zanuzzi C, Barbeito C, Falcón N, Vásquez M. 2012. Identificación de las células de paneth en el intestino delgado de alpacas en los primeros 21 días de edad. *Rev. investig. vet. Perú*, 2012, vol.23, no.2, p.138-146. ISSN 1609-9117
94. Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, Daly K, Maillet EL, Ninomiya Y, Mosinger B, Shirazi-Beechey SP. 2007. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15075–15080.
95. McIntyre N, Holsworth DC, Turner DS. 2005. New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* 2: 20–21.
96. McMahon LR, Wellman PJ. 1998. PVN infusion of GLP-1- (7-36) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: R23-R29.
97. Meeran, K. 1999. Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7–36) amide or exendin-(9–39) alters body weight in the rat. *Endocrinology* 140: 244–250.
98. Mentlein R, Dahms P, Grandt D, Kruger R. 1993. Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *RegulPept* 49: 133-44.
99. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. 1993. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7–36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* 214, 829–835.
100. Merchenthaler I, Lane M, Shughrue P. 1999. Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 403: 261-280.
101. Muscelli, E. 2008. Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 57: 1340–1348.
102. Myojo S, Tsujikawa T, Sasaki M, Fujiyama Y, Bamba T. 1997. Trophic effects of glicentin on rat smallintestinal mucosa in vivo and in vitro. *J. Gastroenterol* 32: 300–305.

103. Nakade Y, Tsukamoto K, Pappas TN, Takahashi T. 2006. Central glucagon like peptide-1 delays solid gastric emptying via central CRF and peripheral sympathetic pathway in rats. *Brain Res.* 1111: 117–121.
104. Navarro M. 1996. Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J. Neurochem.* 67:1982–1991.
105. Nogueiras R. 2009. Direct control of peripheral lipid deposition by CNS GLP-1 receptor signaling is mediated by the sympathetic nervous system and blunted in diet-induced obesity. *J. Neurosci.* 29: 5916–5925.
106. Nowak A, Bojanowska E. 2008. Effects of peripheral or central GLP-1 receptor blockade on leptin-induced suppression of appetite. *J. Physiol. Pharmacol.* 59: 501-510.
107. Ogra P, Welliver R. 2008. Effects of early environment on mucosal immunologic homeostasis, subsequent immune responses and disease outcome. The window of opportunity: pre-pregnancy to 24 months of age. *Nestlé Nutrition Workshop* 60: 145-82.
108. Ohneda A, Ohneda K, Nagasaki T, Sasaki K. 1995. Insulinotropic action of human glicentin in dogs. *Metabolism* 44: 47–51.
109. Orskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FGA, Poulsen SS, Nielsen OV. 1986. Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas. *Endocrinology* 119: 1467-1475.
110. Orskov C, Holst JJ, Nielsen OV. 1988. Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon- (78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. *Endocrinology* 123: 2009–2013.
111. Pérez-Tilve D, González-Matías L, Aulinger B, Alvarez-Crespo M, Gil-Lozano M, Alvarez E, Andrade-Olivie A, et al. 2010. Exendin-4 increases blood glucose levels acutely in rats by activation of the sympathetic nervous system. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298: E1088–E1096.
112. Primeaux SD, Barnes M.J, Braymer HD, Bray GA. 2010. Sensitivity to the satiating effects of exendin 4 is decreased in obesity-prone Osborne-Mendel rats compared to obesity-resistant S5B/Pl rats. *Int. J. Obes. (Lond.)* 34 1427–1433.
113. Ranganath LR. 1996. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? *Gut* 38: 916–919.

114. Ritzel U, Fromme A, Ottleben M, Leonhardt U & Ramadori G. 1997. Release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by carbohydrates in the perfused rat ileum. *Acta Diabetol* 34, 18–21.
115. Rocca AS, Brubaker PL. 1999. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* 140: 1687-1694.
116. Rodríguez J, Cueva S, Lira B, Espinoza J, Vásquez M. 2012. Identificación inmunohistoquímica de transportadores de glucosa intestinal y absorción de glucosa durante el desarrollo y maduración del intestino delgado de crías de alpacas. *Rev inv vet Perú* 2012; 23 (2): 126-137
117. Rodriguez de Fonseca F. 2000. Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism* 49:709–717.
118. Rogers S, Macheda M, Docherty S, Carty M, Henderson M, Soeller W. 2002. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol* 282: E733-738.
119. Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, Deacon CF, Carr RD, Wilken M, Knudsen LB. 2002. The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases β -cell mass in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E745–E752.
120. Rothenberg ME, Eilertson CD, Klein K, Zhou Y, Lindberg I, McDonald JK, Mackin RB, Noe BD. 1995. Processing of mouse proglucagon by recombinant prohormone convertase 1 and immunopurified prohormone convertase 2 in vitro. *J. BiolChem* 270: 10136-10146.
121. Rouille Y, Westermark G, Martin SK, Steiner DF. 1994. Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in aTC1-6 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3242–3246.
122. Rozengurt E, Sternini C. 2007. Taste receptor signaling in the mammalian gut. *Curr Opin Pharmacol* 7: 557–562.
123. Sandoval DA, Bagnol D, Woods SC, D'Alessio DA, Seeley RJ. 2008. Arcuate glucagon-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes* 57, 2046–2054.
124. Sangild P, Schmidt M, Jacobsen M, Fowden A, Forhead A, Avery B, Greve T. 2000. Blood Chemistry, Nutrient Metabolism, and Organ Weights in Fetal and Newborn Calves Derived from In Vitro-Produced Bovine Embryos. *Biol Reprod* 62: 1495 - 1504.

125. Sangild P. 2006. Gut Responses to Enteral Nutrition in Preterm Infants and Animals. *Experimental Biology and Medicine* 231: 1695 -1711.
126. Sauter S, Roffler B, Philipona C, Morel C, Romé B, Guilloteau P, Blum J, Hammon H. 2004. Intestinal Development in Neonatal Calves: Effects of Glucocorticoids and Dependence on Colostrum Feeding. *Biol Neonate* 85:94-104.
127. Schirra J, Nicolaus M, Roggel R, Katschinski M, Storr M, Woerle HJ, and Goke B. 2006. Endogenous GLP-1 controls endocrine pancreatic secretion and antro-pyloro-duodenal motility in humans. *Gut*. 55(2): 243-251
128. Schirra J, Sturm K, Leicht P, Arnold R, Goke B, Katschinski M. 1988. Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7—36)amide in humans. *J. Clin Invest* 101: 1421–1430.
129. Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ. 1989. Oxyntomodulin from distal gut. Role in regulation of gastric and pancreatic functions. *Dig Dis Sci* 34: 1411–1419.
130. Schjoldager BTG, Baldissera FGA, Mortensen PE, Holst JJ, Christiansen J. 1988. Oxyntomodulin: A potential hormone from the distal gut. Pharmacokinetics and effects on gastric acid and insulin secretion in man. *Eur J Clin Invest* 18: 499-503.
131. Schmidt M, Sangild P, Blum J, Andersen J, Greve T. 2004. Glucocorticoid and ACTH administration improves survival and organ maturation in premature calves. *Theriogenology* 61:1729–1744.
132. Scrocchi LA, Brown TJ, Drucker DJ. 1997. Leptin sensitivity in nonobese glucagon-like peptide I receptor $-/-$ mice. *Diabetes* 46: 2029–2034.
133. Scrocchi LA, Brown TJ, MacLusky N, Brubaker PL, Auerbach AB, Joyner AL, Drucker DJ. 1996. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide receptor gene. *Nat Med* 2: 1254–1258.
134. Scrocchi LA, Drucker DJ. 1998. Effects of aging and a high fat diet on body weight and glucose tolerance in glucagon-like peptide-1 receptor $-/-$ mice. *Endocrinology* 139: 3127–3132.
135. Scrocchi LA. 1996. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat. Med.* 2: 1254–1258.
136. Shibata C, Naito H, Jin XL, Ueno T, Funayama Y, Fukushima K, Hashimoto A, Matsuno S, Sasaki I. 2001. Effect of glucagon, glicentin, glucagonlike peptide-1 and -2

- on interdigestive gastroduodenal motility in dogs with a vagally denervated gastric pouch. *Scand J Gastroenterol* 36: 1049–1055.
137. Shimizu I, Hirota M, Ohboshi C, Shima K. 1987. Identification and localization of glucagon-like peptide-1 and its receptor in the brain. *Endocrinology* 121: 1076-1082.
 138. Shughrue PJ, Lane M, Merchenthaler I. 1996. Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 137: 5159–5162.
 139. Sklan D. 2000. Development of the Digestive Tract of Poultry. XXI World Poultry Congress. Montreal, Canada. p 21-24.
 140. Skoglund G, Hussain MA, Holz GG. 2000. Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene promoter activity by protein kinase A independent activation of the rat insulin I gene cAMP response element. *Diabetes* 49: 1156–1164.
 141. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Egan JM, Bonner-Weir S, Habener JF. 2000. Insulinotropic glucagon-like peptide-1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase β -cell mass in mouse pancreas. *Diabetes* 49:741–748.
 142. Szayna M, Doyle ME, Betkey JA, Holloway HW, Spencer RG, Greig NH, Egan JM. 2000. Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. *Endocrinology* 141: 1936–1941.
 143. Tang-Christensen M. 1996. Central administration of GLP-1-(7--36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am. J. Physiol.* 271: R848–R856.
 144. Thorens B, Porret A, B  hler L, Deng SP, Morel P, Widmann C. 1993. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor: demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin- (9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* 42: 1678–1682.
 145. Thum, A. 2002. Endoproteolysis by isolated membrane peptidases reveal metabolic stability of glucagon-like peptide-1 analogs, exendins-3 and -4. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 110: 113–118.
 146. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CMB, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JPH, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR. 1996. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379: 69–72.
 147. Ueda J et al. 2004. Assessment of the effects of exogenous long-acting insulin on glucose tolerance in alpacas. *Am J Vet Res.* 65(12):1688-91.

148. Varndell IM, Bishop AE, Sikri KL, Uttenthal LO, Bloom SR, Polak JM. 1985. Localization of glucagon-like peptide (GLP) immunoreactants in human gut and pancreas using light and electron microscopic immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 33:1080-1086.
149. Vásquez M, Hidalgo C, Rodríguez J, Lira B. 2011. Identificación de células productoras de péptido tipo Glucagon-1 (glp-1) en epitelio intestinal de crías de alpacas. *Memorias de la xxii reunión alpa*, Montevideo, Uruguay.
150. Vásquez M, Rodríguez J, Lira B, Cueva S, Ayón M, Mallma Y. 2012. Ph de la superficie luminal de la mucosa gastrointestinal de crías de alpacas durante las primeras semanas de edad. *Rev. investig. vet. Perú*, vol.23, no.1, p.20-26. ISSN 1609-9117
151. Vilsbøll T, Krarup, T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. 2001. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50: 609–613.
152. Vilsbøll T. 2003. Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 2706–2713.
153. Vrang N. 2008. Upregulation of the brainstem preproglucagon system in the obese Zucker rat. *Brain Res.* 1187: 116–124.
154. Wang H, Iezzi M, Theander S, Antinozzi PA, Gauthier BR, Halban PA, Wollheim CB. 2005. Suppression of Pdx-1 perturbs proinsulin processing, insulin secretion and GLP-1 signalling in INS- 1 cells. *Diabetologia* 48: 720–731.
155. Williams DL, Baskin DG, Schwartz MW. 2006. Leptin regulation of the anorexic response to glucagon-like peptide-1 receptor stimulation. *Diabetes* 55: 3387–3393.
156. Williams DL, Baskin DG, Schwartz MW. 2009. Evidence that intestinal glucagon-like peptide-1 plays a physiological role in satiety. *Endocrinology* 150: 1680–1687.
157. Williams DL, Baskin DG. Schwartz MW. 2006. Leptin regulation of the anorexic response to glucagon-like peptide-1 receptor stimulation. *Diabetes* 55: 3387-3393.
158. Wynne K, Park AJ, Small CJ, Patterson M, Ellis SM, Murphy KG, Wren AM, Frost GS, Meeran K, Ghatei MA, Bloom SR. 2005. Subcutaneous oxyntomodulin reduces body weight in overweight and obese subjects: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes* 54: 2390-2395.

159. Zhang R, Packard BA, Tauchi M, D'Alessio DA, Herman JP. 2009. Glucocorticoid regulation of preproglucagon transcription and RNA stability during stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106: 5913-5918.
160. Zhou J, Wang X, Pineyro MA, Egan JM. 1999. Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulinproducing cells. *Diabetes* 48: 2358–2366
161. Zanuzzi C. 2010. Efectos de la intoxicación con *Solanum glaucophyllum* (duraznillo blanco) sobre la proliferación, diferenciación y muerte celular en el intestino de conejos. Tesis Doctoral. Argentina: Universidad Nacional De La Plata. 286 p.

IX. ANEXOS

ANEXO I. Procedimiento de fijación y parafinado de tejidos para IHQ (Realizado en SENASA)

Los tejidos fueron colocados en canastillas y luego sometidos al siguiente procedimiento:

- 01 hora en alcohol de 80°
- 30 minutos en alcohol de 90°
- 30 minutos en alcohol de 96° (I)
- 30 minutos en alcohol de 96° (II)
- 30 minutos en alcohol de 100° (I)
- 30 minutos en alcohol de 100° (II)
- 30 minutos en alcohol de 100° (III)
- 01 hora en xilol (I)
- 30 minutos en xilol (II)
- 30 minutos en xilol (III)
- 01 hora en parafina (I)
- 30 minutos en parafina (II)

ANEXO II. Desparafinado e hidratación

Las láminas con el tejido parafinado fueron sometidas al siguiente procedimiento:

- | | |
|-----------------|------------|
| - Xilol 1 | 15 minutos |
| - Xilol 2 | 15 minutos |
| - Etanol 100° 1 | 10 minutos |

- Etanol 100° 2 10 minutos
- Metanol (200mL) + Peróxido de Hidrógeno (4mL) 30 minutos
(Inactivación de la peroxidasa endógena).
- Alcohol de 96° 1 5 minutos
- Alcohol de 96° 2 5 minutos
- Alcohol de 70° 5 minutos
- Alcohol de 50° 5 minutos
- Lavado en PBS 1 5 minutos
- Lavado en PBS 2 5 minutos

ANEXO III. Inmunohistoquímica:

Luego de haber sido hidratadas, las láminas de tejido fueron procesadas:

- Recuperación Antigénica en solución buffer citrato
en microondas a 700 watts 10 minutos
- Enfriamiento a temperatura ambiente 30 minutos
- Lavado en PBS 1 5 minutos
- Lavado en PBS 2 5 minutos
- BSA al 1% (inactivación de uniones inespecíficas) 30 minutos
- Incubación con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GLP-1 (Santa Cruz
Biotechnology, USA), durante toda la noche a 4° C.
- Lavado en PBS 1 5 minutos
- Lavado en PBS 2 5 minutos
- Lavado en PBS 3 5 minutos
- Anticuerpo secundario 30 minutos
- Lavado en PBS 1 5 minutos
- Lavado en PBS 2 5 minutos
- Lavado en PBS 3 5 minutos
- Revelado con solución de sustrato cromógeno 3'3 diaminobenzidina (DAB).
- Lavado con agua corriente
- Lavado con agua destilada 2 minutos
- Hematoxilina de Harris 5 segundos
- Lavado con agua corriente

- Lavado con agua destilada 2 minutos

ANEXO IV. Deshidratación y Montaje

Se realizo este último procedimiento para su posterior observación al microscopio

- Alcohol 50° 5 minutos
- Alcohol 70° 5 minutos
- Alcohol 96° 1 5 minutos
- Alcohol 96° 2 5 minutos
- Alcohol 100° 1 5 minutos
- Alcohol 100° 2 5 minutos
- Xilol 1 5 minutos
- Xilol 2 5 minutos
- Montaje con Permount

ANEXO V

Cuadro 2. Número de células L/eje cripta vellosidad en intestino de alpacas.

EDAD	DUODENO	YEUENO	ILEON	CIEGO	COLON
	Media	Media	Media	Media	Media
0 DIAS	0.63	1.73	0.67	0.53	0.47
1-7 DIAS	0.66	1.28	1.23	0.39	0.58
8-15 DIAS	0.96	1.17	1.71	0.49	0.6
16-21 DIAS	0.85	1.23	1.34	0.43	0.75
27-34 DIAS	1.01	1.34	1.45	0.54	0.82
35-45 DIAS	0.95	1.45	1.75	0.47	0.84
ADULTOS	1.17	1.24	1.3	0.6	1.2

Cuadro 3. Número de Células L/eje cripta vellosidad en duodeno de alpacas.

Duodeno						
Días	Media	Desviación Standard	Valor Min.	Valor Max.	Mediana	Moda
0	0.63	0.718	0	2	0.5	0
1-7	0.66	0.558	0	2	1	1
8-15	0.96	0.448	0	2	1	1
16-21	0.85	0.476	0	2	1	1
27-34	1.01	0.449	0	2	1	1
35-45	0.95	0.45	0	2	1	1
Adultos	1.17	0.874	0	3	1	2

Cuadro 4. Número de células L/eje cripta vellosidad en yeyuno de alpacas

Yeyuno						
Días	Media	Desviación Standard	Valor Min.	Valor Max.	Mediana	Moda
0	1.73	0.64	1	3	2	2
1-7	1.28	0.628	0	4	1	1
8-15	1.17	0.457	0	3	1	1
16-21	1.23	0.479	0	3	1	1
27-34	1.34	0.479	1	4	1	1
35-45	1.45	0.62	1	4	1	1
Adultos	1.24	0.435	1	2	1	1

Cuadro 5. Número de células L/eje cripta vellosidad en ileon de alpacas

Íleon						
Días	Media	Desviación Standard	Valor Min.	Valor Max.	Mediana	Moda
0	0.67	0.724	0	2	1	0
1-7	1.23	0.584	0	3	1	1
8-15	1.71	0.882	1	4	1	1
16-21	1.34	0.501	1	3	1	1
27-34	1.45	0.65	1	4	1	1
35-45	1.75	0.742	1	5	2	2
Adultos	1.3	0.466	1	2	1	1

Cuadro 6. Número de células L/eje cripta vellosidad en ciego de alpacas

Ciego						
Días	Media	Desviación Standard	Valor Min.	Valor Max.	Mediana	Moda
0	0.53	0.64	0	2	0	0
1-7	0.39	0.49	0	1	0	0
8-15	0.49	0.589	0	2	0	0
16-21	0.43	0.542	0	2	0	0
27-34	0.54	0.568	0	2	0.5	0
35-45	0.47	0.569	0	2	0	0
Adultos	0.6	0.618	0	3	1	1

Cuadro7. Número de células L/eje cripta vellosidad en colon de alpacas

Colon						
Días	Media	Desviación Standard	Valor Min.	Valor Max.	Mediana	Moda
0	0.47	0.505	0	1	0	0
1-7	0.58	0.592	0	3	1	1
8-15	0.6	0.494	0	1	1	1
16-21	0.75	0.691	0	2	1	1
27-34	0.82	0.58	0	2	1	1
35-45	0.84	0.678	0	3	1	1
Adultos	1.2	0.62	0	3	1	1